

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Jana Smolejová

HPLC stanovení gallové kyseliny jako možného produktu enzymatické reakce šikimové kyseliny, NADP^+ a šikimátdehydrogenasy.

HPLC determination of gallic acid as a possible product of enzymatic reaction of shikimic acid, NADP^+ and SDH.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24. srpna 2017.

Tato práce vznikla za podpory projektů Univerzity Karlovy PROGRES Q46 a UNCE 204025/2012.

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. za vedení práce po odborné stránce, jeho cenné rady a připomínky a za pevné nervy při konzultacích v průběhu vzniku této práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Elišce Novákové za velmi cenné postřehy a její ochotu pomoci, Mgr. Ondřejovi Linhartovi za neocenitelnou pomoc v začátku mé práce, Mgr. Tině Položijové za trefné poznámky, typy při řešení problémů a její nekončící dobrou náladu a v neposlední řadě své rodině, která mě po celou dobu podporovala.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vývojem HPLC metody pro stanovení vybraných chemických látek účastnících se enzymatické reakce, při níž vzniká gallová kyselina. Jedná se o separaci složek reakční směsi, kde výchozími látkami reakce jsou šikimová kyselina, NADP^+ , enzym šikimátdehydrogenasa (SDH) extrahovaný z petržele a předpokládaným (hledaným) produktem je gallová kyselina. Byly vyvinuty dvě metody stanovení pomocí běžně používané kolony s chemicky vázaným oktadecylem na silikagelu a kolony Hypercarb s porézním grafitovým uhlíkem. Pro obě stanovení byla použita UV detekce. Separace pomocí kolony C18 je vhodná zejména pro kvantifikaci výsledku reakce. Z důvodu překryvu píků šikimové kyseliny a NADP^+ je však nutné sledovat současně absorbanci při 212 i 260 nm. Obě látky lze stanovit přepočtem z kalibrací na základě toho, že šikimová kyselina neabsorbuje při 260 nm, zatímco NADP^+ absorbuje při obou. Separace pomocí kolony Hypercarb je vhodná pro studium průběhu reakce, neboť jsou na chromatogramech vidět další produkty, popř. meziprodukty. Stanovení pomocí této kolony se vyznačuje vyšší citlivostí a nižšími limity detekce. Z měření reakčních směsí vyplývá, že pro analýzu kolonou C18 je nejvhodnější složení reakční směsi z TRIS-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid) pufru o pH 9, $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ nebo $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ šikimové kyseliny, $50 \mu\text{l}$ $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ enzymu a doba inkubace 20 hodin. Pro analýzu pomocí kolony Hypercarb je nejvhodnější reakční směs skládající se z AMP-NaOH (2-amino-2-methyl-1-propanol hydrochlorid-NaOH) pufru o pH 9, $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ šikimové kyseliny, $50 \mu\text{l}$ $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ enzymu a dobou inkubace 4 hodiny.

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC, UV detekce, gallová kyselina, šikimová kyselina, NADP^+ , šikimátdehydrogenasa, kolona C18, kolona Hypercarb

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the development of an HPLC method for the determination of selected compounds participating in enzymatic reaction leading to the formation of gallic acid. The analysed reaction mixture contains the following reagents: shikimic acid, NADP^+ and shikimate dehydrogenase (SDH) extracted from parsley; the presumed product of the reaction is gallic acid. Two chromatographic methods for the determination of the above mentioned compounds were developed using C18 HPLC column and porous graphitic carbon Hypercarb column. Molecular absorption spectrometric detection in the UV range was used in all measurements. Separation on the C18 column was found particularly suitable for analysing the composition of the end products of the reaction. Because of the NADP^+ and shikimic acid peak overlap it is necessary to observe absorbance at 212 and 260 nm. Shikimic acid and NADP^+ can be quantified due to the fact that shikimic acid does not absorb at 260 nm while NADP^+ absorb radiation at both wavelengths. Separation via Hypercarb column was found particularly suitable for analysing the process of the reaction; additional products or intermediates can be seen in chromatograms compared to the C18 method. Determination with Hypercarb column is characterized by higher sensitivity and lower limit of detection. It was found that for the determination of all the analytes on the C18 column the most appropriate conditions for the preparation of the reaction mixture would be the following: TRIS-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride) buffer, $\text{pH} = 9$, $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ or $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ of shikimic acid, $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and $50 \mu\text{L}$ of SDH and 20 hours incubation time. For the sample analysis on the Hypercarb column, the optimum reaction mixture consisted of AMP-NaOH (2-amino-2-methyl-1-propanol hydrochloride-NaOH) buffer, $\text{pH} = 9$, $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ shikimic acid, $0.2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and $50 \mu\text{L}$ of SDH and 4 hours incubation time.

KEY WORDS

HPLC, UV detection, gallic acid, shikimic acid, NADP^+ , shikimate dehydrogenase, C18 column, Hypercarb column

OBSAH

1	ÚVOD	10
1.1	Cíl diplomové práce	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Oxidativní stres a antioxidanty	11
2.2	Gallová kyselina	12
2.3	Šikimová kyselina	14
2.4	Šikimátová dráha	14
2.5	HPLC separace složek rostlinných vzorků	17
2.5.1	Kolona C18	18
2.5.2	Kolona Hypercarb	18
2.5.3	Stanovení gallové kyseliny	18
2.5.4	Stanovení šikimové kyseliny	19
2.5.5	Separace reakční směsi	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1	Použité chemikálie	20
3.2	Použité přístroje	20
3.3	Postupy přípravy	20
3.3.1	Příprava standardních roztoků zásobních látek	20
3.3.2	Příprava fosfátového pufru	21
3.3.3	Příprava vzorků	21
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1	Ověření postupů z článků – volba separačního systému	25
4.2	Separací systém C18	25
4.2.1	Optimalizace separačního systému	25

4.2.2	Kalibrační závislost	30
4.3	Separální systém Hypercarb	33
4.3.1	Optimalizace podmínek	33
4.3.2	Kalibrační závislost	36
4.4	Analýza vzorků	39
4.4.1	První set vzorků	39
4.4.2	Druhý set vzorků	45
5	ZÁVĚR.....	49
6	LITERATURA.....	52

SEZNAM ZKRATEK

3-DHS	3-dehydrošikimát
3-DHQ	3-dehydrochinát
<i>a</i>	specifická aktivita
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
AMP-NaOH	2-amino-2-methyl-1-propanol hydrochlorid-NaOH
<i>c</i>	molární koncentrace
C18	stacionární fáze na bázi oktadecylu
CS	chorismát synthasa
DAHPS	3-deoxy-D- <i>arabino</i> -heptulosonát-7-fosfát
DAHPS	3-deoxy-D- <i>arabino</i> -heptulosonát-7-fosfát-synthasa
DHD-SDH	3-dehydrochinátdehydratasa-šikimátdehydrogenasa
DHQS	3-dehydrochinátsynthasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
E4P	D-erytroza-4-fosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPSPS	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát synthasa
EPSP	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát
FMN	flavinmononukleotid
FP	fosfátový pufr
GA	gallová kyselina
H	výškový ekvivalent teoretického patra
<i>H</i>	výška píku – z anglického Height
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
i.d.	vnitřní průměr
k	kapacitní faktor
KV	kvercetin
M	mol dm ⁻³
n	počet teoretických pater

NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<i>PA</i>	plocha píku – z anglického peak area
PEP	fosfoenolpyruvát
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity iontů H ⁺ nebo OH ⁻
P _i	anorganický fosfát
pK _A	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
PVPP	[poly(vinylpolypyrrolidon)]
R	hodnota koeficientu korelace lineárního úseku kalibrace
<i>R_{SA,NADP}</i>	rozlišení šikimové kyseliny a NADPH
RPM	otáčky za minutu
SA	šikimová kyselina
SK	šikimátkinasa
sl.vz.	slepý vzorek
st.p.	standardní přídavek
<i>T</i>	teplota, °C
<i>t</i>	čas
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
UV	ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření
<i>v</i>	průtoková rychlost
<i>V_d</i>	dávkovaný objem
VIS	viditelná oblast spektra elektromagnetického záření
%(v/v)	objemové procento

1 ÚVOD

Antioxidanty jsou významnou složkou obrany organismu proti oxidativnímu stresu, řada studií se také zabývá možností využití těchto látek jako léků proti různým chorobám. Gallová kyselina má v tomto ohledu veliký potenciál. Je však také důležité znát mechanismus její syntézy v rostlinách a možnosti simulace tohoto děje v laboratorních podmínkách.

1.1 Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce je vývoj jednoduché HPLC metody pro stanovení vybraných chemických látek účastnících se enzymatické reakce, při níž vzniká gallová kyselina. Jedná se o separaci složek reakční směsi, kde výchozími látkami reakce jsou šikimová kyselina, NADP^+ , enzym šikimátdehydrogenasa (SDH) extrahovaný z petržele a předpokládaným (hledaným) produktem je gallová kyselina. Sledovány byly především gallová a šikimová kyselina. Z důvodu vyhodnocení koncentrace šikimové kyseliny pak i NADP^+ . Práce je součástí rozsáhlého projektu UNCE 204025/2012 ve spolupráci s katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

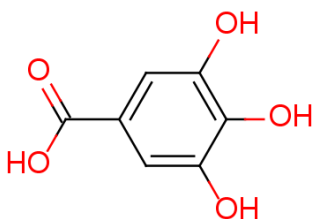
2.1 Oxidativní stres a antioxidanty

Kyslík je nezbytný pro aerobní způsob života, přibližně 5 % buňkami přijatého kyslíku je metabolismem přeměněno na reaktivní formy kyslíku, jako jsou superoxidový anion, peroxid vodíku a hydroxylový radikál, které se účastní buněčné signalizace a homeostáze [1]. Reaktivní formy kyslíku jsou nicméně pro organismus nebezpečné, a kromě jejich vzniku přirozenou cestou je lidské tělo vystavováno vlivům, jako je znečištění životního prostředí, UV a ionizující záření, kouření a stres, které množství reaktivních forem kyslíku ještě zvyšují. Jejich přítomnost v těle se nazývá oxidativní stres. Ten vyvolává poškození DNA, proteinů, lipidů i sacharidů, může také vést k řadě onemocnění jako je aterosklerosa, diabetes mellitus, hypertenze, kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, cystická fibrosa, hemoragie, metabolické poruchy, stárnutí, Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Lidské tělo má proto proti tomuto ději vyvinutou obranu, díky které je udržována rovnováha mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a jejich odstraňováním [2]. Tato obrana zahrnuje preventivní a reparační mechanismy a fyzickou a antioxidační obranu. Enzymatická antioxidační obrana je zajišťována katalasou (H_2O_2 : H_2O_2 -oxidoreduktasa, EC 1.11.1.6), superoxid dismutasou (superoxid:superoxid-oxidoreduktasa; EC 1.15.1.1) a glutathionperoxidasou (glutathion: H_2O_2 -oxidoreduktasa, EC 1.11.1.9). Neenzymatické antioxidační ochrany se účastní např. askorbová kyselina (vitamín C), glutathion, karotenoidy, α -tokoferol (vitamín E).

Poslední jmenovaná látka patří mezi sloučeniny, pro které se často nesprávně používá název polyfenoly [3,4], správný název je benzen-poly-oly. Termín polyfenoly bude v této práci používán s vědomím této nepřesnosti. Polyfenolické látky jsou velká skupina sloučenin, které mají ve své struktuře alespoň jedno aromatické jádro a alespoň jednu hydroxylovou skupinu. Jsou to sekundární metabolity odvozené od skořicové kyseliny, jež je syntetizovaná z fenylalaninu [5]. Polyfenolickým látkám se v posledních letech dostává velké pozornosti díky jejich silným antioxidačním účinkům, které jsou větší, než způsobuje hojně využívaný vitamín C [6]. Zda bude mít daná sloučenina antioxidační vlastnosti, určují 4 hlavní charakteristiky: molekula je donorem vodíku nebo elektronu, stabilizace nepárového elektronu a delokalizační kapacita, reaktivita s ostatními antioxidačními sloučeninami a přechodný chelatační potenciál [7]. Právě tyto vlastnosti se u polyfenolických látek nachází, některé dále mají potenciál působit proti mutacím,

karcinogenitě, zánětům, mikrobům, průjmům, vředům a aterosklerose [8]. Bylo popsáno více než 8 000 polyfenolických látek, které jsou rozříděny na základě počtu a propojení aromatických jader na flavonoidy, stilbeny, lignany a fenolické kyseliny [3,4]. Ty se dělí na hydroxybenzoové kyseliny a hydroxyskořicové kyseliny. Mezi nejznámější hydroxybenzoové kyseliny patří gallová, p-hydroxybenzoová, vanilová, syringová a protokatechová kyselina; mezi hydroxyskořicové kyseliny patří kávová, ferulová, p-kumarová a sinapová kyselina.

2.2 Gallová kyselina



Obr. 2.1 Vzorec gallové kyseliny

Gallová kyselina (GA) je triviální název pro 3,4,5-trihydroxybenzoovou kyselinu, vzorec je na Obr. 2.1. Je to látka tvořící drobné bílé krystalky. Její molekulová hmotnost je $170,12 \text{ g mol}^{-1}$, bod tání je 252°C , její hustota je $1,694 \text{ g cm}^{-3}$, rozpustnost je $11,9 \text{ g l}^{-1}$. Má 4 hodnoty pK_A , v čisté vodě jsou to hodnoty [9]: $\text{pK}_{\text{A}1} = 4,39$; $\text{pK}_{\text{A}2} = 8,49$; $\text{pK}_{\text{A}3} = 10,37$; v 10% acetonitrilu jsou hodnoty $\text{pK}_{\text{A}1} = 4,45$; $\text{pK}_{\text{A}2} = 8,54$; $\text{pK}_{\text{A}3} = 10,91$ a v 30% acetonitrilu jsou hodnoty $\text{pK}_{\text{A}1} = 4,88$; $\text{pK}_{\text{A}2} = 8,76$; $\text{pK}_{\text{A}3} = 11,16$. Hodnoty $\text{pK}_{\text{A}4}$ přesahují hodnotu 13. Ve fosfátovém pufru o pH 3 má 2 absorpční maxima při 220 nm a při 270 nm [10].

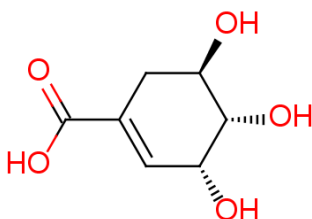
Vyskytuje se v rostlinách, nejvíce v dubové kůře, duběnkách, škumpě, čajových lístcích a ovoci, hlavně v hroznovém víně. Dříve byla hlavní složkou duběnkového inkoustu, dnes se používá při zpracování a balení potravin a v kosmetice pro zabránění žluknutí tuků, kde má srovnatelnou účinnost jako analog tokoferolu Trolox nebo askorbová kyselina [11].

Gallová kyselina je fenolická kyselina patřící mezi polyfenolické antioxidanty. Mnoho studií ukazuje, že kromě antioxidačních, antimelanogenních, antineoplastických a bakterio-statických vlastností má mnoho dalších, díky kterým by mohla hrát významnou roli v léčbě některých onemocnění [12,13]. Spolu se svými deriváty je cytotoxická pro krysí hepatocyty [14] a pro myši [15] i lidské leukemické buňky [16], dále působí proti rakovinným buňkám prostaty

[17] a je kandidátem na léčbu karcinomu mozku [18], protože snižuje životaschopnost, proliferaci a angiogenezi lidských gliových buněk. Slibné jsou výsledky pro použití gallové kyseliny jako účinné látky proti viru Herpes simplex [19].

Gallová kyselina je sekundární metabolit rostlin, hub i bakterií a je prekurzorem pro syntézu hydrolyzovatelných taninů neboli tříslovin. Existovalo několik teorií o způsobu syntézy GA vycházejících z šikimátové dráhy [20]. První teorie předpokládaly syntézu gallové kyseliny z fenylalaninu přes kávovou kyselinu nebo 3,4,5-trihydroxykyselinu. Další možností byla dehydratace 3-dehydrošikimátu na protokatecholovou kyselinu, která je následně hydroxylována. Poslední teorií, která se ukázala jako správná, je přímá oxidace 3-dehydrošikimátu na gallovou kyselinu [21,22]. Enzym šikimátdehydrogenasa (šikimát:NADP⁺-oxidoreduktasa, EC 1.1.1.25) je zodpovědná jak za reakci vedoucí k šikimátu, tak ke gallové kyselině. Bylo také prokázáno, že syntéza probíhá pomocí bifunkční šikimát dehydrogenasy [22] nikoliv pomocí dehydrošikimát dehydrogenasy, jak bylo nejdříve předpokládáno [21]. Reakce vedoucí ke vzniku šikimové kyseliny je redukce karbonylové skupiny na třetím uhlíku (C-3) cyklické struktury 3-dehydrošikimátu (3-DHS). Kofaktor NADP a 3-DHS musejí být správně orientovány, aby mohlo dojít k tomu, že zatímco je H⁻ seshora dodán na C-3, může se H⁺ ihned vázat na formující se O⁻. Gallová kyselina vzniká ve dvou krocích. Nejprve dochází k opačné reakci, tedy k oxidaci šikimové kyseliny na 3-dehydrošikimát tak, že NADP⁺ vytrhne H⁻ z šikimové kyseliny a H⁺ z hydroxylové skupiny se vrací do kruhové struktury. V druhém kroku se 3-DHS vertikálně natočí tak, že pátý uhlík (C-5) kruhové struktury se dostane do stejné pozice jako C-3 při přeměně šikimové kyseliny na 3-DHS. V této pozici je hydroxylová skupina pátého uhlíku dole a vodík je nahoře a dojde k oxidaci 3-dehydrošikimátu na 3,5-dehydrošikimát, který poté spontánně keto enol tautomerií přejde na gallovou kyselinu. Protože hydroxylová skupina na čtvrtém uhlíku a karboxylová skupina na prvním uhlíku je stejná jako při přeměně 3-dehydrošikimátu na šikimovou kyselinu, může enzym katalyzovat jak oxidaci šikimové kyseliny na 3-dehydrošikimát, tak i oxidaci 3-dehydrošikimátu na gallovou kyselinu.

2.3 Šikimová kyselina



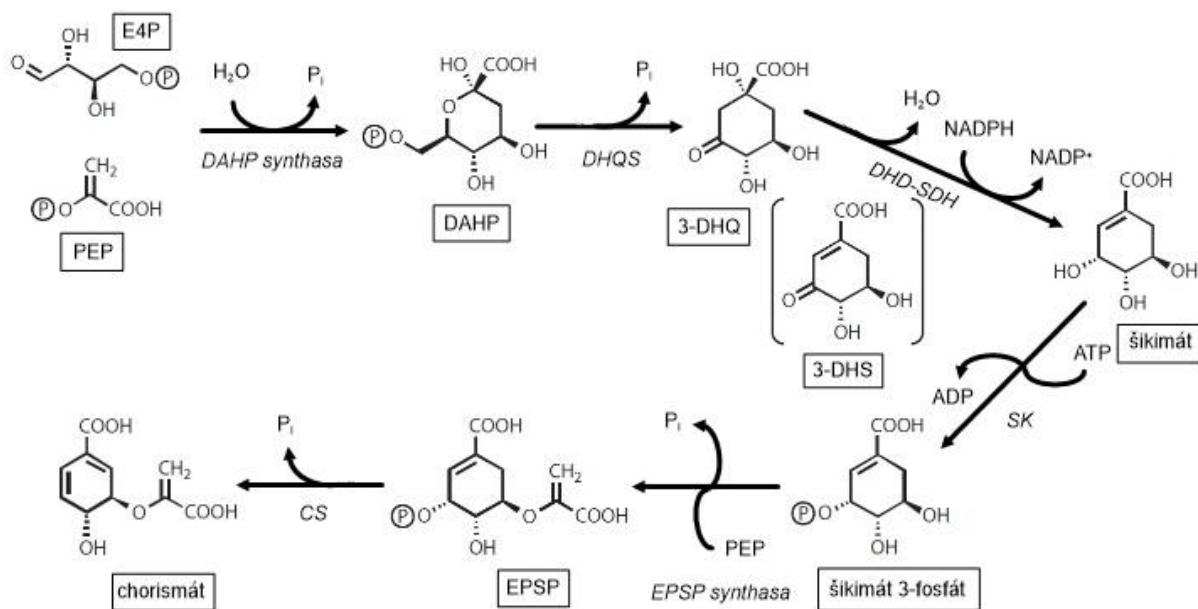
Obr 2.2 Vzorec šikimové kyseliny

Šikimová kyselina (SA) je triviální název pro (3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxycyklohexenkarboxylovou kyselinu, její vzorec je na Obr. 2.2. Nazývá se podle ovoce *Illicium religiosum*, známého jako japonský hvězdíkovitý anýz, v japonštině šikimi, ze kterého byla jako první izolovaná [23]. Je to bílá pevná látka s bodem tání 183 – 184,5 °C. Ve vodě je dobře rozpustná. Rozpuštěná v ethanolu má absorpční maximum při 212 nm [24]. Vzniká v bakteriích, houbách a v plastidech rostlin jako součást šikimátové dráhy [23], která je popsána v kapitole 2.4. Používá se jako surovina pro výrobu léku proti chřipce Tamiflu [25].

2.4 Šikimátová dráha

Důležitou součástí metabolismu je tvorba aminokyselin. Existuje několik metabolických drah, kterými jsou jednotlivé skupiny aminokyselin syntetizovány. Jednou z nich je dráha pro syntézu aromatických aminokyselin tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu. Tyto aminokyseliny jsou důležitými prekurzory přirozených rostlinných produktů, které hrají roli pro růst, vývoj a rozmnožování. Tryptofan je prekurzorem alkaloidů, indolových glukosinolátů (slouží k obraně proti škůdcům), fytoalexinů (jsou to rostlinná antibiotika) a hormonu auxinu [26]; tyrosin je prekurzor pro isochinolinové alkaloidy, pigment betalain a chinony [27] a fenylalanin je prekurzor mnoha fenolických sloučenin jako flavonoidů, kondenzovaných taninů a ligninu [28]. V některých rostlinách tvoří deriváty fenylalaninu až 30 % veškeré organické hmoty [29,30]. Syntéza aromatických aminokyselin se skládá z šikimátové dráhy (Obr. 2.3), která dává vzniknout společnému prekurzoru chorismátu, a individuálních postchorismátových drah, které vedou ke vzniku jednotlivých aminokyselin. Tyto dráhy se nacházejí v bakteriích, houbách, rostlinách a některých protistech, ale nikoliv u zvířat. Proto jsou aminokyseliny tryptofan, tyrosin,

fenylalanin a některé jejich deriváty společně s lysinem, methioninem a threoninem esenciálními živinami, které je nutné přijímat v potravě [31,32]. Aromatické aminokyseliny jsou prekurzory serotoninu, dopaminu a katecholaminů [33]. Některé z nich jsou průmyslově vyráběny stejně jako nízkokalorické sladidlo aspartam [34].



Obr. 2.3 Šikimátová dráha. Názvy a zkratky enzymů jsou psané kurzivou, názvy a zkratky produktů jednotlivých reakcí jsou v rámečku.

Šikimátová dráha se nazývá podle prvního identifikovaného intermediátu šikimátu [23] a skládá se ze sedmi enzymatických reakcí, které jsou lokalizované v plastidech [35–37]. Přeměna intermediátů glykolýzy a pentosofosfátového cyklu, fosfoenolpyruvátu a D-erytroso-4-fosfátu, je zapojena do centrálního metabolismu uhlíku. Výsledným produktem je chorismát, univerzální prekurzor pro syntézu aromatických aminokyselin a mnoha derivátů od nich odvozených.

První reakcí šikimátové dráhy je aldolová kondenzace fosfoenolpyruvátu a D-erytroso-4-fosfátu enzymem 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátsynthasa (DAHPS; EC 2.5.1.54), kdy vzniká 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát (DAHP) [38,39]. Enzym DAHPS patří mezi metalloenzymy a pro svoji aktivitu potřebuje přítomnost manganatých kationtů a redukovanou formu thioredoxinu, čímž propojuje tok uhlíku do šikimátové dráhy s tokem elektronů z fotosystému I [40]. Existují dvě formy DAHPS, které jsou kódovány dvěma různými

geny [37,41]. Exprese genu *DAHPS2* je kontinuální, zatímco exprese genu *DAHPS1* je silně indukována jako odpověď na poranění nebo infekci [42,43].

Druhým krokem je přeměna 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonát-7-fosfátu na 3-dehydrochinát (3-DHQ) pomocí enzymu 3-dehydrochinátsynthasa (DHQS; EC 4.2.3.4) v přítomnosti dvouvalentního kovového kationtu a NAD^+ jako kofaktoru [44,45]. Tato přeměna probíhá pěti následnými reakcemi: alkoholovou oxidací, β -oxidací anorganického fosfátu, karbonylovou redukcí, otevřením aromatického kruhu a intramolekulární aldolovou kondenzací, které jsou lokalizované v jednom aktivním centru, a nevznikají žádné vedlejší produkty.

Třetí a čtvrtá reakce šikimátové dráhy, které jsou katalyzovány bifunkčním enzymem 3-dehydrochinátdehydratasa-šikimátdehydrogenasa (DHD-SDH; EC 4.2.1.10 a EC 1.1.1.25), zahrnují zavedení první dvojné vazby do kruhu pomocí dehydratace 3-dehydrochinátu na 3-dehydrošikimát (3-DHS) a reverzibilní redukcí 3-dehydrošikimátu na šikimát pomocí NADPH [46,47]. Aktivní centra DHD a SDH jsou lokalizována naproti sobě ve velké blízkosti, díky čemuž je lokálně zajištěna optimální koncentrace 3-dehydrošikimátu pro účinnou katalýzu [48]. Enzym SDH má téměř desetkrát větší aktivitu než enzym DHD, což dále zajišťuje efektivní přeměnu na šikimát a tím se zvyšuje metabolický spád šikimátové dráhy [47]. U většiny rostlin je tento enzym kódován jedním genem, výjimku tvoří například *Nicotiana tabacum*, která obsahuje geny dva [46,49,48].

Šikimátkinasa (SK; ATP:šikimát-fosfotransferasa, EC 2.7.1.71) katalyzuje pátou reakci, ve které dochází k fosforylaci hydroxylové skupiny na třetím uhlíku šikimátu za pomoci ATP jako kofaktoru a přítomnosti dvouvalentního kationtu za vzniku šikimát-3-fosfátu [50–52]. Šikimátkinasa se objevuje ve více isoformách, jejich počet závisí na druhu rostliny a jsou kódovány více geny [53,54,50]. Již přes 400 milionů let se v rostlinách vyskytují také homology bez katalytické funkce, což naznačuje, že se mohla vyvinout nová enzymatická funkce, která nesouvisí s šikimátovou dráhou.

Předposledním krokem je vznik 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátu (EPSP). Enzym 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasa (EPSPS; fosfoenolpyruvát:šikimát-3-fosfát-karboxyvinyltransferasa EC 2.5.1.19) katalyzuje transfer enolpyruvyly (části fosfoenolpyruvátu) na šikimát 3-fosfát do pozice 5-hydroxyl [55,56]. Tato tříuhlíkatá jednotka se buď stane vedlejším řetězcem vznikajícího fenylalaninu a tyrosinu, nebo může být během biosyntézy tryptofanu odstraněna. Exprese genu pro EPSPS je nízká, ale zvyšuje se při odpovědi na infekci a nedostatku sulfátů [57,58]. Vzhledem k tomu, že šikimátová dráha je součástí metabolismu rostlin, ale nikoliv

zvířat, je na ní namířen nejpoužívanější neselektivní herbicid glyfosát [N-(fosfonomethyl)glycin, prodáváný pod názvem Roundup[®]], který kompetitivně inhibuje EPSPS [59]. Některé bakterie mají geny pro EPSPS, která téměř není inhibována glyfosátem, a tyto geny byly přeneseny do geneticky modifikovaných rostlin, na které glyfosát nepůsobí, tzv. Roundup-ready rostliny [60,61].

Chorismátsynthasa (CS; 5-O-(1-karboxyvinyl)-3-fosfošikimát-fosfátlyasa (chorismát tvořící), EC 4.2.3.5) katalyzuje poslední reakci šikimátové dráhy, kterou je 1,4-anti-eliminace 3-fosfátu a C6-pro-R vodíku z EPSP za vzniku chorismátu [62]. Při této reakci dochází k zavedení druhé dvojné vazby do kruhu. Ačkoliv je reakce redoxně neutrální, chorismát synthasa potřebuje pro svou funkci kofaktor flavinmononukleotid (FMN), který přechodně dodává jeden elektron EPSP, a tím usnadňuje štěpení fosfátu [63]. Redukovaný FMN je produkován buď fotoredukací pomocí modrého světla, nebo flavinreduktasou, která není fyzicky spojena s chorismátsynthasou [64,65]. Chorismát je centrální metabolit v rostlinných buňkách sloužící jako prekurzor pro syntézu aromatických aminokyselin a také jako iniciační substrát pro syntézu řady dalších metabolitů, jako vitamín B9, salicylát, vitamín K1 a mnoho pigmentů [66–69].

2.5 HPLC separace složek rostlinných vzorků

Častým způsobem analýzy a kvantifikace složek rostlinných vzorků je HPLC separace s UV-VIS detekcí nebo hmotnostní detekcí [70]. Výhoda UV-VIS detekce je v pořizovací i provozní ceně a jednoduchosti. Běžně dostupné moderní komerční chromatografy mají k dispozici spektrometrický detektor s diodovým polem, který umožňuje měřit chromatogramy se záznamem současně při mnoha vlnových délkách (mnohdy přímo záznamy celých spekter), což je vhodné právě proto, že většina složek organických materiálů obsahuje skupiny nebo struktury absorbující v UV oblasti světla a často také mají svá specifická maxima ve spektru. Tyto látky obvykle obsahují uhlíkovou kostru, což zase umožňuje jejich vzájemnou separaci běžně používanými kolonami s chemicky vázaným oktadecylem.

2.5.1 Kolona C18

Kolony se stacionární fází na bázi oktadecylu chemicky vázaného na silikagel patří mezi nejpoužívanější kolony pro HPLC separace s reverzními fázemi. Má omezený pH rozsah, obvykle v rozmezí 2 – 8, není stabilní při vysokých teplotách a tlacích [71]. Látky jsou vzájemně separovány na základě jejich rozdílné hydrofobicity. Čím je látka hydrofóbnější, tím je stacionární fází více zadržována.

2.5.2 Kolona Hypercarb

V této práci je pro separaci analytů použita i kolona Hypercarb od firmy Thermo Scientific [72,73]. Stacionární fází je 100% vysoce porézní grafitový uhlík ve vrstvách s hexagonálně uspořádanými atomy tvořící velkou polynukleární aromatickou molekulu. Povrch je krystalický a vysoce reprodukovatelný s úplnou absencí mikropórů, plocha povrchu je $120 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Je stabilní v rozmezí pH 0 – 14, ve vysokých koncentracích solí, při vysokých teplotách a tlacích.

Mechanismus interakce je závislý na polaritě a tvaru molekul. Retence je způsobena adsorpcí a interakcemi polárních molekul indukujících náboj na polarizovatelném povrchu grafitu. Síla adsorpce závisí na velikosti plochy molekuly interagující s grafitovým povrchem a na druhu a pozici funkčních skupin molekuly vůči grafitovému povrchu. Planární molekuly jsou více zadržovány než molekuly s třídimenzionálním rigidním uspořádáním. Druhý mechanismus, nábojem indukovaný dipól, způsobuje silné zadržování polárních analytů. Pokud se k povrchu přiblíží molekula s permanentním dipólem, způsobí vznik indukovaného dipólu, což vede k silné interakci, na kterou nemá vliv celkový náboj molekuly. To umožňuje rozdělení analytů, které na klasických kolonách separovat nelze, jako jsou polární látky, geometrické izomery, diastereoizomery, oligosacharidy a polychlorované bifenyle.

2.5.3 Stanovení gallové kyseliny

Antioxidanty a společně s nimi také gallová kyselina jsou již dlouhou dobu předmětem výzkumu. Vzhledem k tomu, že se vyskytují v rostlinných tkáních, houbách a bakteriích [4], byla vyvinuta řada separačních metod, které umožňují jak studium výskytu těchto látek, tak i jejich vlastností [74]. Vzorky pro separaci jsou obvykle velmi komplexní, a proto jsou analýzy poměrně

dlouhé. Analyty obsahují různé počty aromatických jader, hydroxylových, karbonylových, karboxylových skupin a různě dlouhé uhlíkaté řetězce. Proto je vhodné použití chromatografie s reverzními fázemi. Nejčastěji jsou používány všechny varianty oktadecylových kolon. Jako mobilní fáze je často volena 0,1 – 1% mravenčí kyselina v kombinaci s acetonitrilem nebo methanolem [75–84]. Dalšími nejčastěji používanými vodnými složkami mobilních fází jsou fosfátový pufr [85] nebo trifluoroctová kyselina [86]. Často se volí UV-VIS spektrometrická detekce nebo detekce pomocí hmotnostní spektrometrie.

2.5.4 Stanovení šikimové kyseliny

Stanovení šikimové kyseliny většinou probíhalo v rámci studia šikimátové dráhy, jejíž je součástí. S tím také souvisí metody, kterými byla stanovována a není vyvinuto mnoho extrakčních [87] a chromatografických metod k její separaci [88–91]. Několik autorů uvádí její separaci pomocí iontové výměnné chromatografie, některé zaměřené na izolaci šikimové kyseliny [92], některé spíše na separaci analytů vzorku [93]. V rámci adsorpční chromatografie byla pro separaci složek vzorku pro analýzu *Rhizoma Smilacis galbrae*, léku tradiční čínské medicíny, použita pro tento účel běžně využívaná kolona na bázi oktadecylu, jako mobilní fáze byla použita mravenčí kyselina s acetonitrilem [94]. Pro analýzu složek vzorku červeného vína byla též použita kolona na bázi oktadecylu, jako mobilní fáze fosfátový pufr s 3% methanolem [95].

2.5.5 Separace reakční směsi

Tato práce je zaměřená na separaci složek reakční směsi, kde výchozími látkami reakce jsou šikimová kyselina, NADP^+ , enzym šikimátdehydrogenasa (SDH) extrahovaný z petržele a předpokládaným (hledaným) produktem je gallová kyselina. Dostupné jsou 3 práce věnující se studiu vzniku gallové kyseliny, kde je použit separační krok. Nejstarší práce z roku 1997 [20] uvádí použití kolony Nucleosil RP18 (4,5 x 250 mm) s mobilní fází 25% methanol. Práce z roku 2003 [21] uvádí použití kolony Superspher 100 RP-18 (250 x 4 mm i.d., 4 μm , Merck) a jako mobilní fázi kyselinu fosforečnou o koncentraci 0,1 mol dm^{-3} . Nejnovější práce z roku 2011 [22] uvádí použití kolony Onyx Monolithic C-18 (100 x 3 mm, Phenomenex) a mobilní fáze 0,1% mravenčí kyseliny a methanolu s gradientovou elucí.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Všechny vodné roztoky byly připravovány z deionizované vody produkované zařízením Milli Q_{PLUS} firmy Millipore (USA).

Pro přípravu mobilní fáze byla používána kyselina fosforečná (85 %, p. a. čistota, Merck, Německo), hydroxid sodný (99,3 %, Lachner, ČR) a acetonitril ($\geq 99,9$ %, HPLC čistota, Sigma Aldrich, USA).

Všechny standardy byly pevné látky: monohydrát gallové kyseliny ($\geq 99,9$ %, HPLC čistota, Sigma Aldrich, USA), šikimová kyselina ($\geq 99,9$ %, Sigma Aldrich, USA), NADP – disodná sůl (98 %, Roche Diagnostics, Německo).

3.2 Použité přístroje

Pro přípravu roztoků byly používány váhy Sartorius RC210D, pH metr Adwa AD 1000, ultratenké magnetické míchadlo značky Fischer Scientific, automatické pipety, ultrazvuková lázeň Elmasonic E 30 H firmy Elma.

Pro separaci byla použita biokompatibilní přístrojová sestava UHPLC Dionex Ultimate RS3000, kolona Gemini 3 μ m C18 110A (250 x 3,00 mm, Phenomenex, USA) s předkolonkou Gemini C18 (3 μ m, 4 x 3 mm, Phenomenex, USA) a kolona Hypercarb (3 μ m, 150 x 3 mm, Thermo Scientific, USA) s předkolonkou Hypercarb (3 μ m, 10 x 3 mm, Thermo Scientific, USA)

3.3 Postupy přípravy

3.3.1 Příprava standardních roztoků zásobních látek

Zásobní roztoky byly připraveny tak, že bylo naváženo vypočítané množství standardu, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno po rysku. V případě roztoků pro stanovení na koloně C18 byly doplněny acetonitrem (NADP byl nejprve rozpuštěn v minimu deionizované vody), pro stanovení na koloně Hypercarb byly doplňovány směsí acetonitrilu a vody vždy

ve stejném poměru jako u mobilní fáze. Zásobní roztoky nemohly být připraveny s fosfátovým pufrům, protože NADP se v prostředí fosfátů rozpadá.

3.3.2 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr byl připravován každý den čerstvý titrací 0,1 mol dm^{-3} roztoku kyseliny fosforečné, která byla připravována odměřením vypočítaného objemu koncentrované kyseliny fosforečné a doplněním deionizovanou vodou po rysku odměrné baňky, a 2 mol dm^{-3} roztoku hydroxidu sodného, který byl připravován rozpuštěním naváženého vypočítaného množství pevného hydroxidu sodného a doplněním po rysku odměrné baňky, do požadovaného pH. Roztok pufru byl poté ultrazvukován po dobu 15 minut pro odstranění rozpuštěných plynů.

3.3.3 Příprava vzorků

Kvůli malému objemu reakční směsi byly vzorky připravovány pipetováním daných objemů přímo do vialek. Pro separaci na koloně C18 byla reakční směs ředěna acetonitrilem v poměru 1:3, pro separaci na koloně Hypercarb byla reakční směs ředěna 30% acetonitrilem v poměru 1:1.

Reakční směsi byly připravovány v laboratoři katedry biochemie, konkrétně RNDr. Veronikou Hýskovou, Ph.D. a Mgr. Kateřinou Bělonožníkovou.

Postup přípravy byl následující. Nejprve byl izolován enzym SDH. Ke 100 g navážené, omyté a nastrohané petržele byla přidána polovina malé lžičky poly(vinylpyrrolidonu) (PVPP) a 300 ml pufru s označením A, který se skládal ze 100 mmol dm^{-3} Tris-HCl pufru o pH 7,8; 1 mmol dm^{-3} DTT; 1 mmol dm^{-3} EDTA a 5 mmol dm^{-3} Mg^{2+} .

Tato směs byla 30 minut centrifugována na 9 000 RPM při 4 °C a dále se pracovalo se supernatantem. Z něj bylo odebráno 100 μl pro změření aktivity SDH a ve zbylém supernatantu byly sráženy bílkoviny síranem amonným do 33% nasycení. Směs byla 30 minut centrifugována na 9 000 RPM při 4 °C, byl slit supernatant, ve kterém byly opět sráženy bílkoviny síranem amonným z 33% na 60% nasycení. Směs byla opět 30 minut centrifugována na 9 000 RPM při 4 °C. Dále se pracovalo se sedimenty, které byly rozpuštěny a doplněny na 10 ml pufrům s označením B, který se skládal z 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl o pH 7,8; 1 mmol dm^{-3} EDTA; 5 mmol dm^{-3} chloridu hořečnatého; 0,5 mmol dm^{-3} DTT a 5% glycerolu.

Z roztoku sedimentů bylo odebráno 50 μl , které byly 5x zředěny pufrům B a byla stanovena aktivita SDH. Zbylým roztokem sedimentů bylo naplněno dialyzační střevo, které bylo promyto vodou a krátce ekvilibrováno ponořením do pufru B. Naplněné dialyzační střevo bylo ponořeno do kádinky s 1 l míchaného pufru B a bylo necháno v míchačce dialyzovat v chladicím boxu přes noc. Další den bylo odstřiženo dialyzační střevo, vylily se sedimenty a byl změřen jejich objem. Bylo odebráno 50 μl , které byly 5x zředěny pufrům B pro stanovení aktivity SDH. Vzorek pro měření aktivity byl připraven smícháním 400 μl AMP-NaOH o pH 9; 30 μl 100mmol dm^{-3} šikimové kyseliny; 20 μl 10 mmol dm^{-3} NADP⁺; 500 μl deionizované vody a 50 μl extraktu. Byla měřena absorbance při 340 nm po dobu 180 s.

Zbylé sedimenty byly rozděleny iontovou chromatografií. Byla použita kolona (1,5x12 cm) se stacionární fází 2x recyklovanou DEAE-celulosou, která byla dříve předem promyta 60 ml pufru B. Pro separaci byl použit lineární gradient 0 – 0,3 mol dm^{-3} chloridu sodného o průtokové rychlosti 1 ml min^{-1} (celkový objem 250 ml). Následně byla kolona promyta ještě 125 ml 0,3mol dm^{-3} chloridu sodného v pufru. Byly jímány frakce, u kterých byla měřena aktivita SDH při 280 nm. Aktivní frakce byly slity a bylo provedeno srážení síranem amonným do 80% nasycení. Směs byla centrifugována 20 min při 4 °C na 9 000 RPM. Byly odebrány sedimenty a resuspendovány ve 100 μl pufru B.

Tato směs byla dále separována gelovou chromatografií. Směs byla nadávkována na kolonu Sephacryl S-300 (1,2 x 57 cm), která byla předem promyta pufrům B. Pufr B byl také použit jako mobilní fáze, její průtoková rychlost byla 0,2 ml min^{-1} . Byly sbírány jednotlivé frakce, u kterých byla měřena aktivita SDH při 280 nm. Aktivní frakce byly slity a tím vznikl finální enzymový preparát.

Enzymový preparát byl izolován dvakrát a proto byly i reakční směsi připravovány ve dvou setech. Reakční směsi se skládaly z 50 μl enzymu a různých objemů zásobních roztoků 0,1mol dm^{-3} šikimové kyseliny a 0,01mol dm^{-3} NADP, tak aby odpovídaly níže uvedeným výsledným koncentracím, 400 μl 0,25mol dm^{-3} pufru (výsledná koncentrace 0,1 mol dm^{-3}) a deionizovanou vodu o takovém objemu, aby výsledný objem směsi byl 1 ml. Reakční směsi byly inkubovány při 30 °C po různou dobu, poté byly denaturovány při 98 °C po dobu 2 minut a zmrazeny pro zastavení reakce. Ke každé reakční směsi byl připraven slepý vzorek, který byl připraven stejným způsobem, ale přidáný enzym byl denaturován varem.

První set (označení 1 – 16) byl připraven 5. 5. 2016 a složení směsí je uvedeno v Tab. 3.1.

Tab. 3.1 Složení reakčních směsí prvního setu z 5. 5. 2016

ozn. vzorku	typ pufru	pH pufru	$c_{SA} \cdot 10^3$ mol dm ⁻³	$c_{NADP} \cdot 10^3$ mol dm ⁻³	t_{inkubace} hod
1, 2	Tris-HCl	9	10	2	4
3, 4	AMP-NaOH	9	10	2	4
5, 6	Tris-HCl	9	4	2	4
7	Tris-HCl	8	4	2	4
8	Tris-HCl	7	4	2	4
9, 10	Tris-HCl	9	10	0,2	0,25
11, 12	AMP-NaOH	9	10	0,2	0,25
13, 14	Tris-HCl	9	4	0,2	0,25
15	Tris-HCl	8	4	0,2	0,25
16	Tris-HCl	7	4	0,2	0,25

V reakčních směsích druhého setu bylo měněno mnohem více parametrů, nicméně základní složky zůstaly stejné, pH pufru bylo vždy 9. Nejprve byly připraveny reakční směsi pro studium vlivu délky inkubace (17, 18), pro opětovné ověření vhodnosti pufru byly připraveny tři reakční směsi (19 – 21) a jako poslední byly připraveny reakční směsi s přidavkem gallové kyseliny a kvercetinu (22 – 35). Složení těchto reakčních směsí je uvedeno v Tab. 3.2. Pro každou reakční směs byl připraven také slepý vzorek.

Tab. 3.2 Složení reakčních směsí druhého setu

ozn. vzorku	typ pufru	$c_{SA} \cdot 10^3$ mol dm ⁻³	$c_{NADP} \cdot 10^3$ mol dm ⁻³	$t_{inkubace}$ hod	přídavek ^a , $c \cdot 10^3$ mol dm ⁻³
17a	AMP-NaOH	6	2	1	-
17b	AMP-NaOH	6	2	2	-
17c	AMP-NaOH	6	2	3	-
17d	AMP-NaOH	6	2	4	-
18a	AMP-NaOH	3	2	1	-
18b	AMP-NaOH	3	2	2	-
18c	AMP-NaOH	3	2	3	-
18d	AMP-NaOH	3	2	4	-
19	AMP-NaOH	3	2	4	-
20	Tris-HCl	3	2	4	-
21	glycin-NaOH	3	2	4	-
22	AMP-NaOH	3	0,2	4	-
23	AMP-NaOH	3	0,2	4	GA; 1,0
24	AMP-NaOH	3	0,2	4	GA; 0,5
25	AMP-NaOH	3	0,2	4	GA; 0,1
26	AMP-NaOH	3	0,2	4	KV; 1,0
27	AMP-NaOH	3	0,2	4	KV; 0,5
28	AMP-NaOH	3	0,2	4	KV; 0,1
29	AMP-NaOH	3	0,2	0,5	-
30	AMP-NaOH	3	0,2	0,5	GA; 1,0
31	AMP-NaOH	3	0,2	0,5	GA; 0,5
32	AMP-NaOH	3	0,2	0,5	GA; 0,1
33	AMP-NaOH	3	0,2	0,5	KV; 1,0
34	AMP-NaOH	3	0,2	0,5	KV; 0,5
35	AMP-NaOH	3	0,2	0,5	KV; 0,1

^a koncentrace přidaného standardu v celkovém objemu vzorku

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Ověření postupů z článků – volba separačního systému

Pro separaci daných analytů byl na základě rešerše nejprve zvolen reverzní mód HPLC s kolonou na bázi oktaedecylu vázaném na silikagelu od firmy Phenomenex.

Jako mobilní fáze byla nejprve zvolena směs methanolu a vody s kyselinou fosforečnou [96] a mravenčí kyselinou [22]. Poté byla použita směs acetonitrilu s $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselinou fosforečnou [21]. Ani jedna separace nebyla úspěšná, nicméně směs acetonitrilu s kyselinou fosforečnou, případně s fosfátovým pufrům, se jevila nadějně pro optimalizaci podmínek.

Jako druhý separační systém byl zvolen reverzní mód HPLC s kolonou Hypercarb na bázi porézního grafitového uhlíku od firmy Thermo Scientific. Mobilní fáze byla jako v prvním případě směs acetonitrilu s $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselinou fosforečnou.

4.2 Separační systém C18

4.2.1 Optimalizace separačního systému

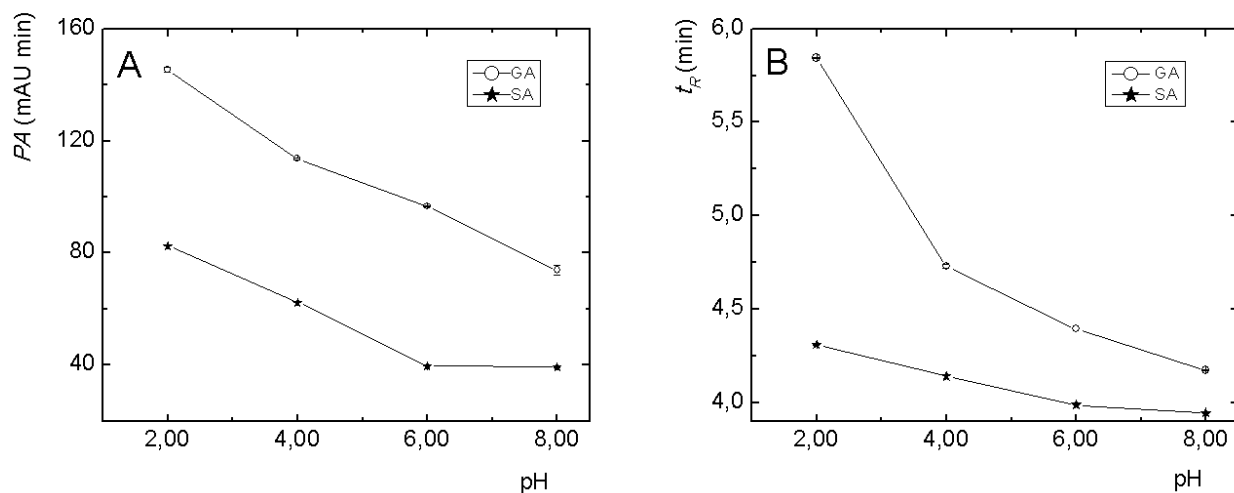
Prvním cílem optimalizace bylo dostatečné rozdělení gallové kyseliny od šikimové kyseliny, až po jeho dosažení byla věnována pozornost separaci šikimové kyseliny a NADP^+ .

Jako první byl zkoumán vliv pH fosfátového pufru na retenci analytů. Se zvyšujícím se pH mobilní fáze docházelo ke zmenšování plochy píků i retenčního času (Obr. 4.1). Optimálním se tedy jeví pH 2,00, ale pro další měření bylo používáno pH 2,50, aby se prodloužila životnost kolony. Rozdělení píků gallové kyseliny a šikimové kyseliny proběhlo dostatečně, rozlišení je 3,60 a následující optimalizace byly prováděny za účelem vylepšení rozlišení NADP^+ a šikimové kyseliny, zlepšení tvaru píků a případného zkrácení doby analýzy.

Jak gallová kyselina, tak i šikimová kyselina má 4 hodnoty pK_A . Zásadní vliv na chování obou kyselin má pK_A karboxylové skupiny. Tyto hodnoty jsou podobné, a proto lze pozorovat i stejný trend závislosti chování kyselin na změně pH. Při nízkých hodnotách pH jsou jak karboxylové, tak hydroxylové skupiny protonizované, molekuly jsou tedy bez náboje a může proto docházet k separaci na základě interakcí typických pro kolonu C18, viz chromatogram na Obr. 4.2.

Vzhledem k tomu, že největší pufrací kapacita fosfátového pufru se nachází spíše v neutrální oblasti pH, a to od 5,9 až po 8,0 škály, nejví se jako ideální pufr pro použití při zvoleném pH 2,50. Byl proto hledán vhodnější pufr, jehož efektivní tlumivý účinek je blíže požadovanému pH. Z běžně používaných pufrů tomuto požadavku odpovídají systémy [97] kyselina chlorovodíková – glycin s tlumivým intervalem pH 1,1 – 3,7; citronová kyselina – dihydrogencitronan draselný s tlumivým intervalem 2,2 – 3,6; hydrogenfosforečnan sodný – citronová kyselina s tlumivým intervalem 2,2 – 8,0 a Brittonův – Robinsonův pufr s tlumivým intervalem 1,8 – 12,0. Ze slabých organických kyselin byly vybrány mravenčí kyselina s $pK_A = 3,76$; maleinová kyselina s $pK_{A1} = 1,83$ a ethylendiamintetraoctová kyselina s $pK_{A1} = 1,99$. Všechny zmíněné kyseliny nebo pufrы kromě Brittonova – Robinsonova pufru absorbují ve stejných oblastech spektra jako analyzované látky, tudíž není možné je použít.

Byla změřena závislost retenčních časů a ploch píků gallové a šikimové kyseliny s Brittonovým – Robinsonovým pufrem jako součástí mobilní fáze a ukázalo se, že výsledky jsou prakticky stejné. Vzhledem ke složitější přípravě Brittonova – Robinsonova pufru byl nadále používán fosfátový pufr.

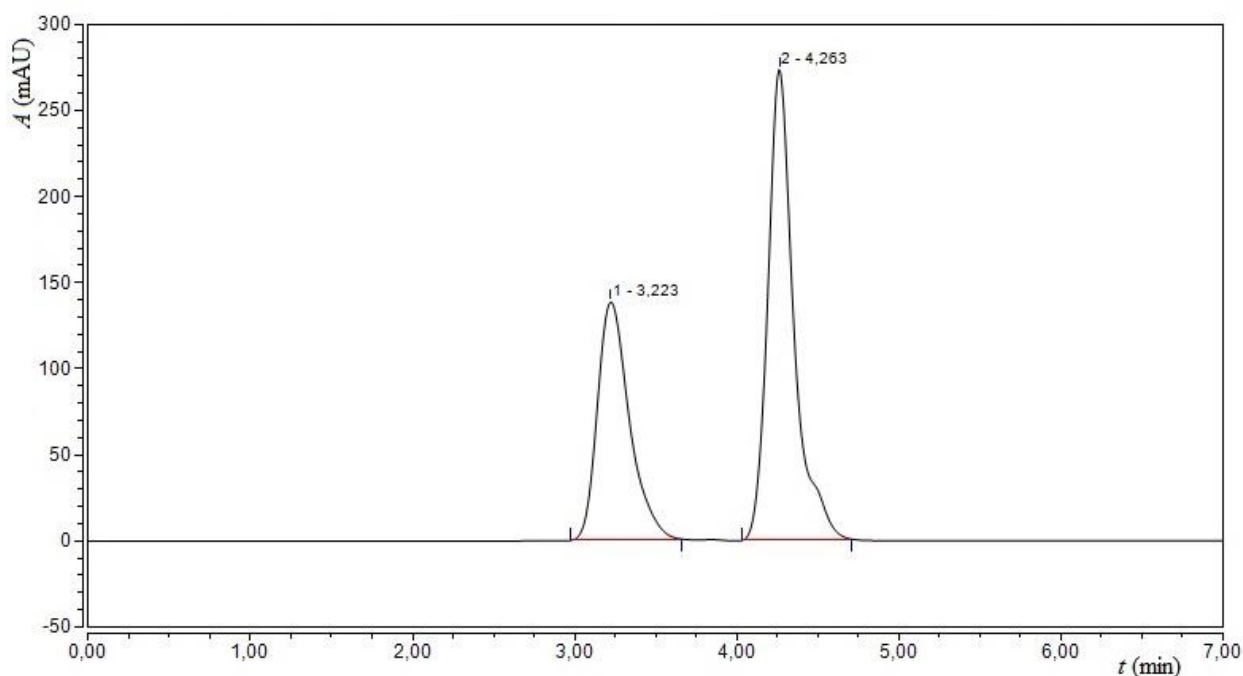


Obr. 4.1 Graf závislosti A: ploch píků a B: retenčních časů GA a SA na pH fosfátového pufru

$c_{SA} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{GA} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ FP} : \text{CH}_3\text{CN} = 85 : 15 \%$;

$\nu = 0,350 \text{ ml min}^{-1}$; $V_d = 20 \text{ }\mu\text{l}$; $T_{kolona} = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda = 230 \text{ nm}$

Dalším krokem bylo otestovat vliv teploty kolony na separaci. Teplota byla měněna po 5 °C v rozmezí 15 až 30 °C. Se zvyšující se teplotou docházelo ke značnému zkrácení retenčních časů až o čtvrtinu, avšak také ke snížení plochy píků na cca 75 %. Rozlišení gallové kyseliny a šikimové kyseliny bylo v každém případě dostatečné, NADP⁺ a šikimovou kyselinu se ovšem vlivem změn teploty nepodařilo rozdělit, jak je zřejmé z chromatogramu na Obr. 4.2. Jako optimální byla vybrána teplota 30 °C (rozlišení bylo 3,40) z důvodu snížení zpětného tlaku kolony, tudíž možnosti použití vyššího průtoku mobilní fáze a tím zkrácení analýzy. Vyšší teploty nebyly použity, protože analyty při vyšších teplotách degradují. Teplota vzorků v autosampleru neměla na separaci vliv, proto byly ponechány při laboratorní teplotě.



Obr. 4.2 Chromatogram roztoku standardů GA a SA při 30 °C

Pík 1 – SA+NADP⁺, pík 2 – GA, za pomlčkou jsou retenční časy.

$c_{SA} = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{GA} = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; 0,1 mol dm⁻³ FP : CH₃CN = 85 : 15 %;

pH_{FP} = 2,50; $\nu = 0,300 \text{ ml min}^{-1}$; $V_d = 20 \text{ } \mu\text{l}$; $T_{kolona} = 30 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\lambda = 212 \text{ nm}$

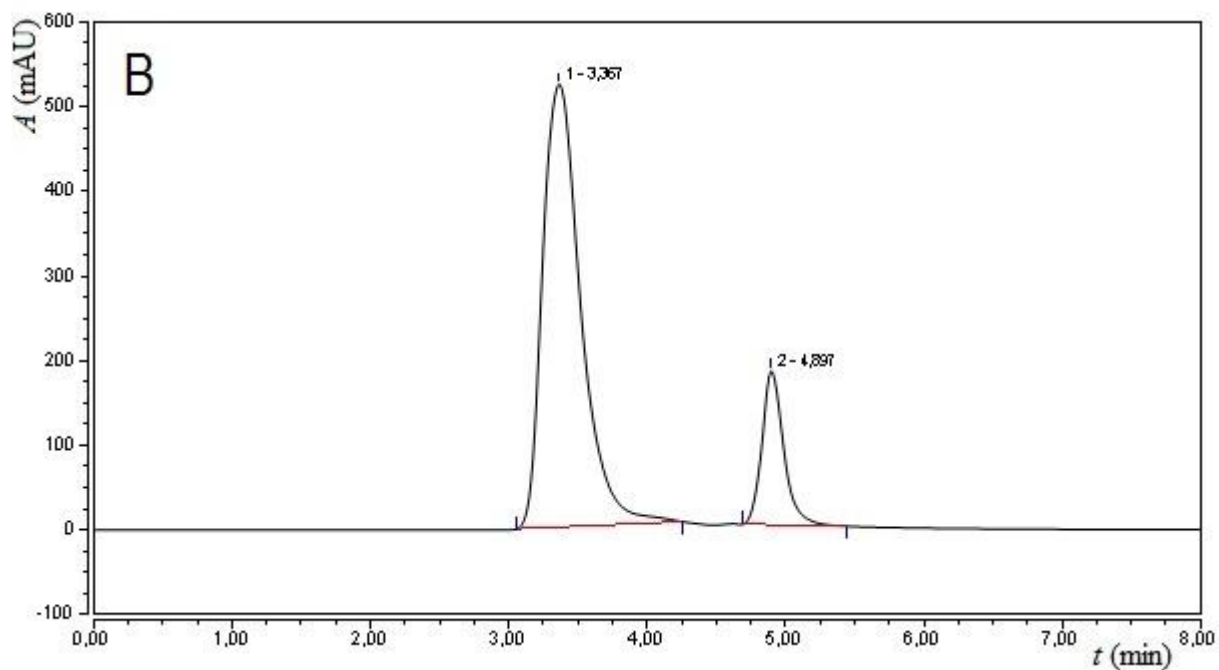
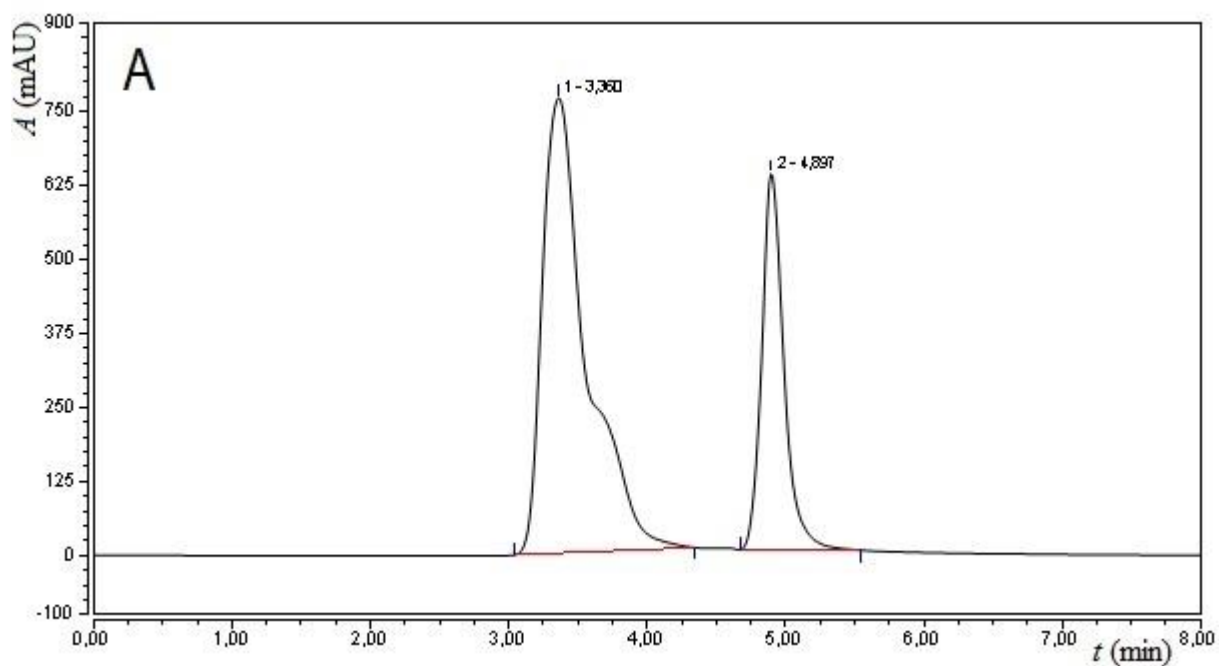
Vliv iontové síly byl testován přidáním 0,5; 1; 2 a 3% chloridu sodného do fosfátového pufru. Ukázalo se, že vyšší iontová síla nemá na separaci žádný vliv, a proto dále byla jako mobilní fáze používána směs acetonitrilu a fosfátového pufru bez přídavku jiné soli.

Jeden z nejdůležitějších faktorů je poměr vodné a organické složky mobilní fáze. Protože acetonitril je s fosfátovým pufrem omezeně mísitelný, měření závislosti na obsahu organické složky probíhalo ve směru zvyšování jeho obsahu a jen do poměru 70 : 30 % fosfátového pufru ku acetonitrilu. Se zvyšujícím se podílem acetonitrilu v mobilní fázi docházelo ke snižování retence NADP^+ a GA. Z těchto důvodů nikdy nedošlo k separaci SA a NADP^+ až na základní linii. S vyšším podílem acetonitrilu v mobilní fázi také docházelo k deformaci tvaru píků, proto byl zvolen podíl acetonitrilu v mobilní fázi 15 %, kdy separace proběhla úspěšně s dostatečným rozlišením společného píku šikimové kyseliny s NADP^+ a píku gallové kyseliny s ohledem na co nejkratší dobu analýzy.

Kvantifikace u překrývajících se píků šikimové kyseliny a NADP^+ proběhne pomocí vyhodnocení při dvou rozdílných vlnových délkách. Šikimová kyselina má totiž za daných podmínek absorpční maximum při 212 nm, zatímco NADP^+ má jedno absorpční maximum při 210 nm a druhé menší při 260 nm. Tento fakt umožňuje z 3D záznamu celých UV spekter vyhodnotit plochu píku NADP^+ při 260 nm, která je poté pomocí kalibrační závislosti přepočítána na teoretickou plochu píku při 212 nm. Tato vypočítaná plocha píku je poté odečtena od společné plochy píku šikimové kyseliny a NADP^+ a tím je určena i samotná plocha píku šikimové kyseliny. Plocha píku gallové kyseliny je vyhodnocována při 212 nm.

Vzhledem k tomu, že prioritou optimalizace podmínek již nebylo rozdělení všech tří analytů, byla ponechána průtoková rychlost mobilní fáze na nejvyšší možné hodnotě s přihlédnutím k možnosti, že při analýze vzorků může dojít k mírnému zanesení frity předkolonky a tím ke zvýšení zpětného tlaku kolony. Tato hodnota je $0,350 \text{ ml min}^{-1}$.

Shrnutí podmínek separace po optimalizaci jednotlivých faktorů se nachází v Tab. 4.1. Chromatogram separace modelové směsi, tj. roztoku standardů za zvolených podmínek je na Obr. 4.3, vypočítané chromatografické charakteristiky jsou uvedeny v Tab. 4.2, rozlišení $R_{SA+\text{NADP}^+, GA}$ je rovno 4,06.



Obr. 4.3 Chromatogram roztoku standardů za zvolených podmínek pro separaci SA, NADP⁺ a GA na koloně C18,

A: $\lambda = 212$ nm, pík 1 – SA+NADP⁺, pík 2 – GA; B: $\lambda = 260$ nm, pík 1 – NADP⁺, pík 2 – GA; za pomlčkou jsou retenční časy

$c_{SA} = 1,00 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³; $c_{NADP} = 1,00 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³; $c_{GA} = 1,00 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³; pH_{FP} = 2,50; 0,1 mol dm⁻³ FP : CH₃CN = 85 : 15 %; $\nu = 0,350$ ml min⁻¹; $V_d = 20$ μ l; $T_{kolona} = 30$ °C

Tab. 4.1 Zvolené podmínky separace SA, NADP⁺ a GA pro kolonu C18

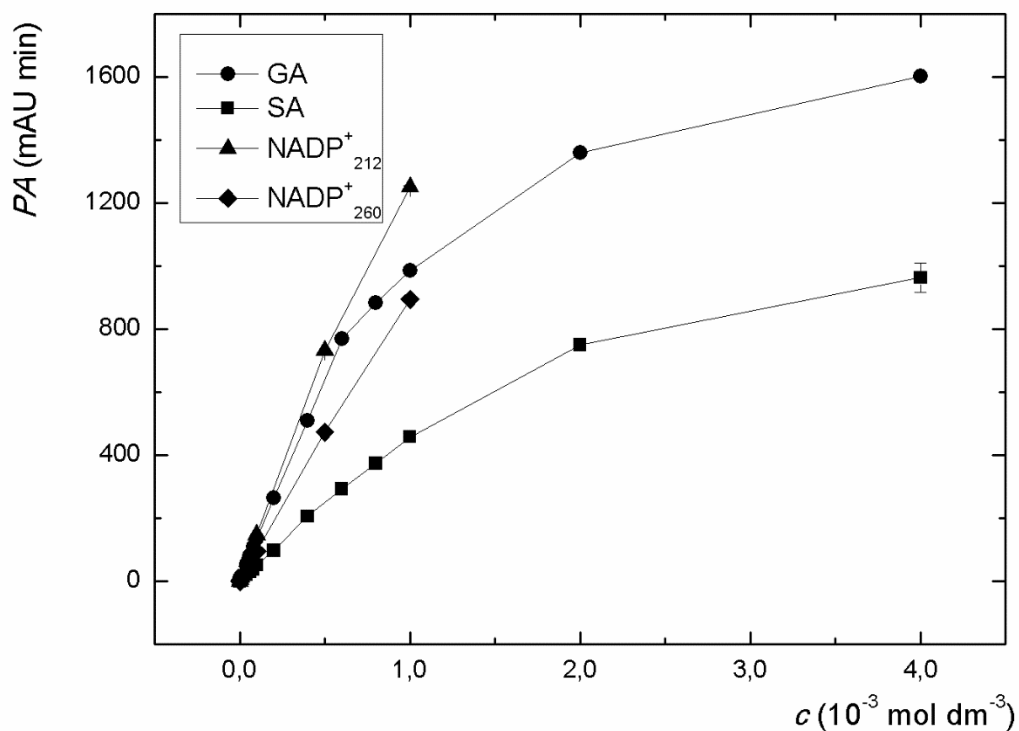
Parametr	Hodnota parametru
pH roztoku fosfátového pufru	2,50
poměr fosfátový pufr:acetonitril	85:15 %(v/v)
průtoková rychlost mobilní fáze	0,350 ml min ⁻¹
dávkovaný objem	20 µl
teplota vyhřívání kolony	30 °C
detekce – vlnová délka	212 nm, 260 nm

Tab. 4.2 Chromatografické parametry pro modelový roztok separovaný kolonou C18

parametr	SA + NADP ⁺	GA
k	0,155	0,683
n	755	5194
H [mm]	0,33	0,048

4.2.2 Kalibrační závislost

Pro každý ze tří analytů byla změřena kalibrační závislost. Jak pro gallovou kyselinu, tak pro šikimovou kyselinu byla použita řada roztoků standardů v rozmezí koncentrací od $5,00 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ do $4,00 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³. Pro kalibrační závislost NADP⁺ byla použita řada roztoků standardů v rozmezí koncentrací od $3,00 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ do $1,00 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³. Kalibrační závislost byla měřena při dvou vlnových délkách, 212 nm a 260 nm, byly vyhodnoceny plochy (Obr. 4.4). Taktéž byly určeny velikosti lineárních úseků kalibrace (Obr. 4.5) a další parametry charakterizující metodu, které jsou pro všechny 3 sledované látky sepsány v Tab. 4.3. Z rovnic přímek proložených lineárními úseky kalibračních závislostí byl soustavou dvou rovnic vyřešen přepočet pro určení podílu NADP⁺ a SA ve společném píku.



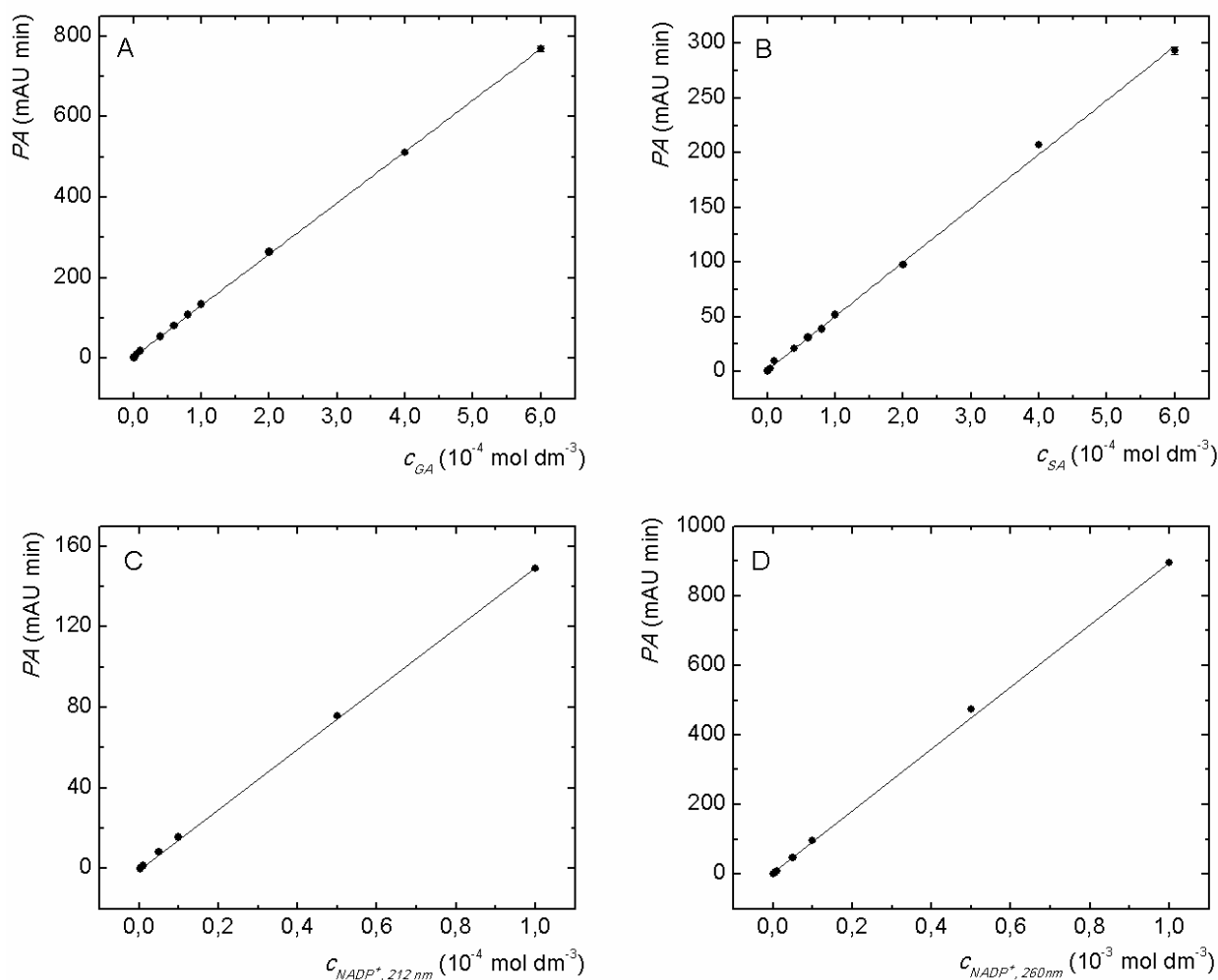
Obr. 4.4 Kalibrační závislost ploch píků GA, SA, NADP⁺ při 212 nm a NADP⁺ při 260 nm pro kolonu C18

0,1 mol dm⁻³ FP : CH₃CN = 85 : 15 %; pH_{FP} = 2,50; ν = 0,350 ml min⁻¹; V_d = 20 μ l;

T_{kolona} = 30 °C;

Tab. 4.3 Charakteristiky metody stanovení kolonou C18

parametr	SA	GA	NADP ⁺ _{212nm}	NADP ⁺ _{260nm}
R	0,999	0,999	0,999	0,999
citlivost (dm ³ mol ⁻¹)	$5,0 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^5$
opakovatelnost (%)	0,96	7,66	0,38	0,50
LDR (mol dm ⁻³)	$1,7 \cdot 10^{-6}$ - $6 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$ - $6 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$
LOD (mol dm ⁻³)	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$6,0 \cdot 10^{-7}$
LOQ (mol dm ⁻³)	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$



Obr. 4.5 Lineární úseky kalibračních závislostí ploch píků A: GA, B: SA, C: NADP⁺ při 212 nm a D: NADP⁺ při 260 nm pro kolonu C18

0,1 mol dm⁻³ FP : CH₃CN = 85 : 15 %; pH_{FP} = 2,50; ν = 0,350 ml min⁻¹; V_d = 20 μ l;

T_{kolona} = 30 °C

Korelační koeficient 0,999 pro všechny čtyři kalibrační závislosti ukazuje, že zvolené úseky závislostí jsou opravdu lineární a rovnice přímek odpovídají realitě. Stejně tak uvedená relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti ukazuje, že metoda je precizní. Nejcitlivější je tato metoda pro NADP⁺ při 212 nm, nejméně pro šikimovou kyselinu. Všechny tyto charakteristiky jsou vypočítány z vyhodnocených ploch píků tak, jak je v chromatografických metodách běžné, protože jde o přesnější a preciznější způsob vyhodnocování než z výšek píků. U reálných vzorků jsou proto také vyhodnocovány plochy píků. Výpočet limitu detekce a stanovitelnosti byl poněkud obtížný, neboť běžné postupy vedly k nereálným hodnotám. Nejprve byly počítány pomocí střední

hodnoty chyby proložení lineárního úseku kalibrace přímkou. Hodnoty limitů detekce se pohybovaly řádově v setinách až desetínách mmol dm^{-3} , což neodpovídá požadavkům na metodu ani realitě, protože experimentálně byla nejnižší změřitelná koncentrace např. šikimové kyseliny $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Proto byly limity detekce a stanovitelnosti vypočítány také ze šumu základní linie. Tyto hodnoty vybočují zase na druhou stranu a jsou o 1 – 3 řády, nižší, než je nejmenší experimentálně změřitelná koncentrace analytů. Její hodnoty byly tedy nakonec použity jako meze detekce do Tab. 4.3.

4.3 Separační systém Hypercarb

4.3.1 Optimalizace podmínek

Při optimalizaci podmínek separace na koloně Hypercarb bylo postupováno podobně jako u systému C18, jehož výsledné optimální podmínky byly použity jako výchozí pro tuto optimalizaci a byly tedy dále upravovány.

Jako první byl optimalizován obsah organické složky mobilní fáze, konkrétně acetonitrilu. Bylo postupováno od nejnižšího obsahu, odpovídajícímu 5 %, k vyšším hodnotám. Z výsledků měření s roztoky standardů opět vyplývá, že se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu v mobilní fázi dochází ke snižování retence analytů. Jako nejvhodnější byl vybrán obsah acetonitrilu 30 %, protože při nízkých hodnotách docházelo k přílišnému zadržování analytů ve stacionární fázi, naopak při vyšších hodnotách byly píky analytů deformované. Jako další bylo ověřeno, zda je acetonitril nejlepší organická složka mobilní fáze. Byl testován methanol a ethanol, ale ukázalo se, že při použití těchto látek nedochází na této koloně k vzájemné separaci žádného z analytů, proto byl nadále používán acetonitril.

Druhým optimalizovaným parametrem bylo pH fosfátového pufru. Ještě před samotnou řadou mobilních fází o vzrůstajícím pH byly vybrány pufrы o pH 2,00 a pH 6,00; tedy pH menší a větší než jsou pK_{A1} obou kyselin pro ověření, zda je možné očekávat stejné chování jako v případě kolony C18. Ukázalo se však, že v případě pufru o pH 6,00 se na chromatogramu neukázal žádný pík ani při velmi dlouhé době analýzy. Tento fakt vedl k hypotéze, že při vyšších hodnotách pH není gallová kyselina stabilní a dochází k jejímu rozpadu nebo polymerizačním reakcím a kolona Hypercarb je vůči těmto vlivům mnohem citlivější než kolona C18. V literatuře [98] je popsána změna absorpčního spektra gallové kyseliny, ale až v alkalickém prostředí

a v neutrálním pH vodného roztoku by měla být stabilní. Na separaci tedy má zřejmě vliv jak hodnota pK_A , tak stabilita této látky v prostředí o různých pH. Jako optimální byl zvolen fosfátový pufr o pH 3,00; protože tato hodnota je dostatečně nízká oproti hodnotám pK_{A1} obou kyselin, ale zároveň se co nejvíce přibližuje pK_A kyseliny fosforečné, čím se zvyšuje pufrací kapacita použitého pufru.

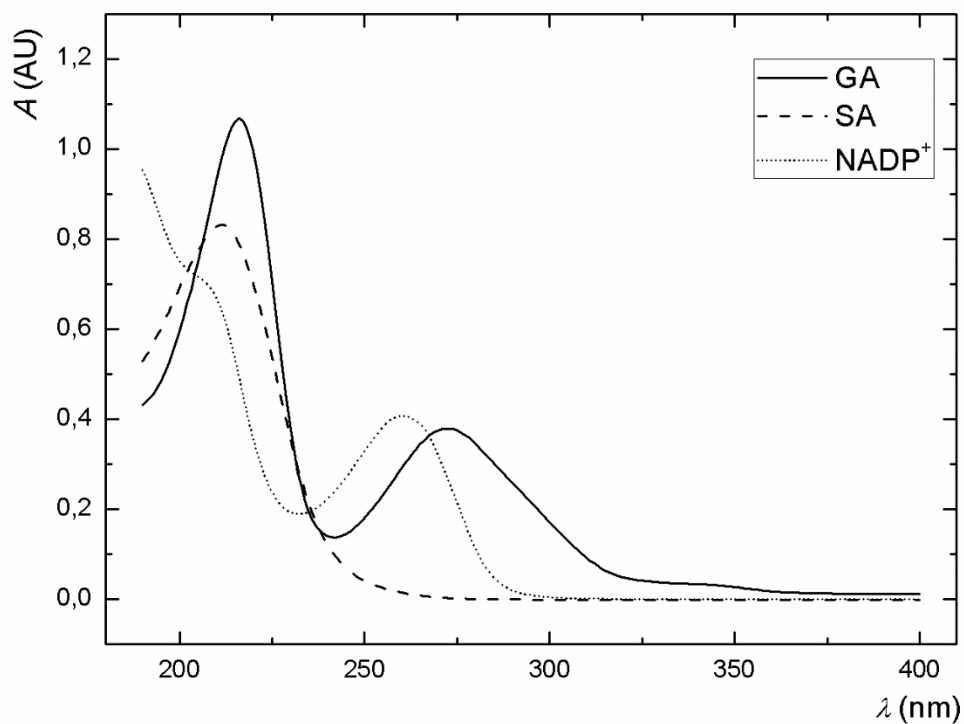
Dalším testovaným parametrem byla teplota. Teplota vyhřívání kolony byla ponechána stejná jako v předchozím separačním systému na 30 °C, protože zmenšením odporu kapalin je možné použít vyšší průtokovou rychlost a zkrátit tak analýzu. Teplota vzorků v autosampleru vykazovala mírnou tendenci ovlivňovat separaci analytů. Tento jev je přičítán tomu, že kolona Hypercarb je velmi citlivá i na drobnou degradaci standardu gallové kyseliny. Vzorky v autosampleru byly proto chlazeny na 15 °C.

Vzhledem k tomu, že se všechny tři analyty v modelovém směsném vzorku dostatečně oddělily, byla pro průtokovou rychlost mobilní fáze vybrána co nejvyšší hodnota tak, aby byla zachována rezerva pro nárůst tlaku v případě, že by reálné vzorky mírně zanášely fritu předkolonky. Zvolená průtoková rychlost tedy je 0,800 ml min⁻¹.

Pro kalibraci i kvantifikaci obsahů všech 3 sledovaných látek ve vzorcích byla zvolena vlnová délka 212 nm, protože při této vlnové délce absorbovaly všechny látky a všechna ostatní maxima v jejich spektrech (Obr. 4.6) byla nižší. Shrnutí výsledků optimalizace podmínek pro separaci analytů na koloně Hypercarb se nachází v Tab. 4.4, chromatogram separace směsného standardu je na Obr. 4.7 a vypočítané charakteristiky separace jsou uvedeny v Tab. 4.5, rozlišení šikimové kyseliny a NADP⁺ $R_{SA,NADP^+}$ je 3,21 a rozlišení NADP⁺ a gallové kyseliny $R_{NADP^+,GA}$ je 12,09.

Tab. 4.4 Zvolené podmínky separace SA, NADP⁺ a GA na koloně Hypercarb

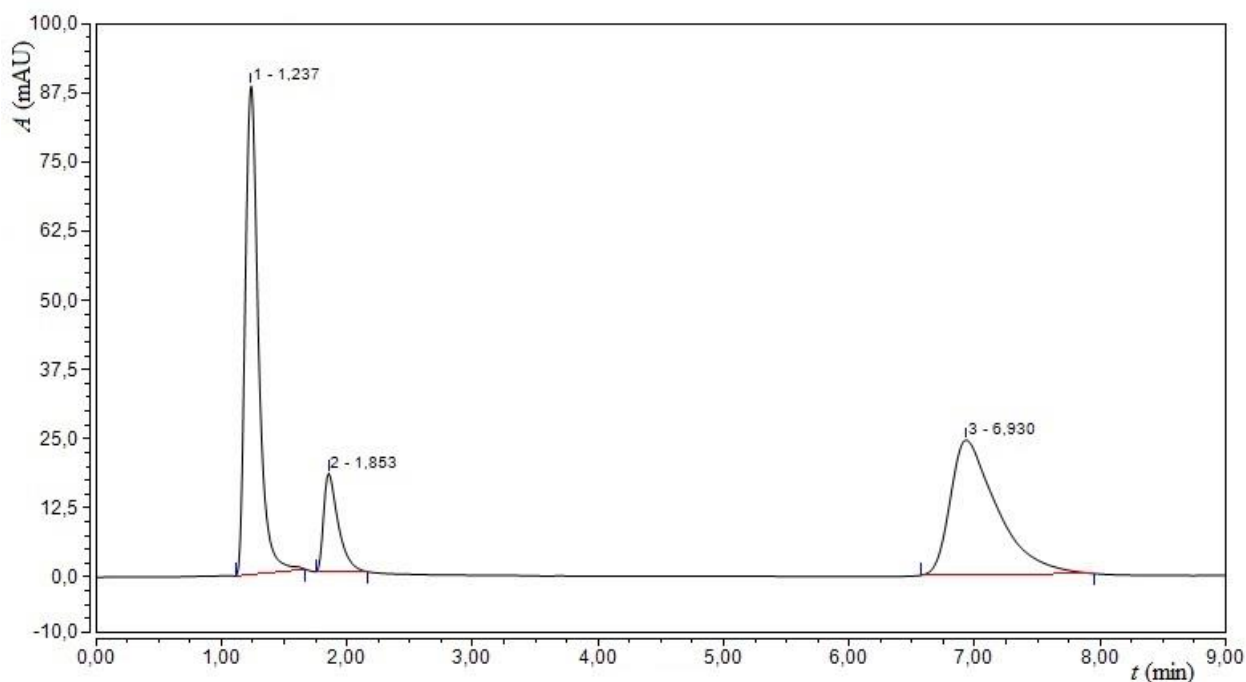
Parametr	Hodnota parametru
pH fosfátového pufru	3,00
poměr fosfátový pufr:acetonitril	70:30 %(v/v)
průtoková rychlost mobilní fáze	0,800 ml min ⁻¹
dávkový objem	20 µl
teplota vzorků	15 °C
teplota vyhřívání kolony	30 °C
detekce – vlnová délka	212 nm



Obr. 4.6 Spektra roztoků standardů SA, NADP⁺ a GA, každý o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ rozpuštěných v 30% acetonitrilu po separaci na koloně Hypercarb
Podmínky separace viz Tab. 4.4.

Tab. 4.5 Chromatografické parametry separace SA, NADP a GA kolonou Hypercarb

parametr	SA	NADP ⁺	GA
k	0,237	0,853	5,93
n	727	1367	1864
H [mm]	0,21	0,11	0,08



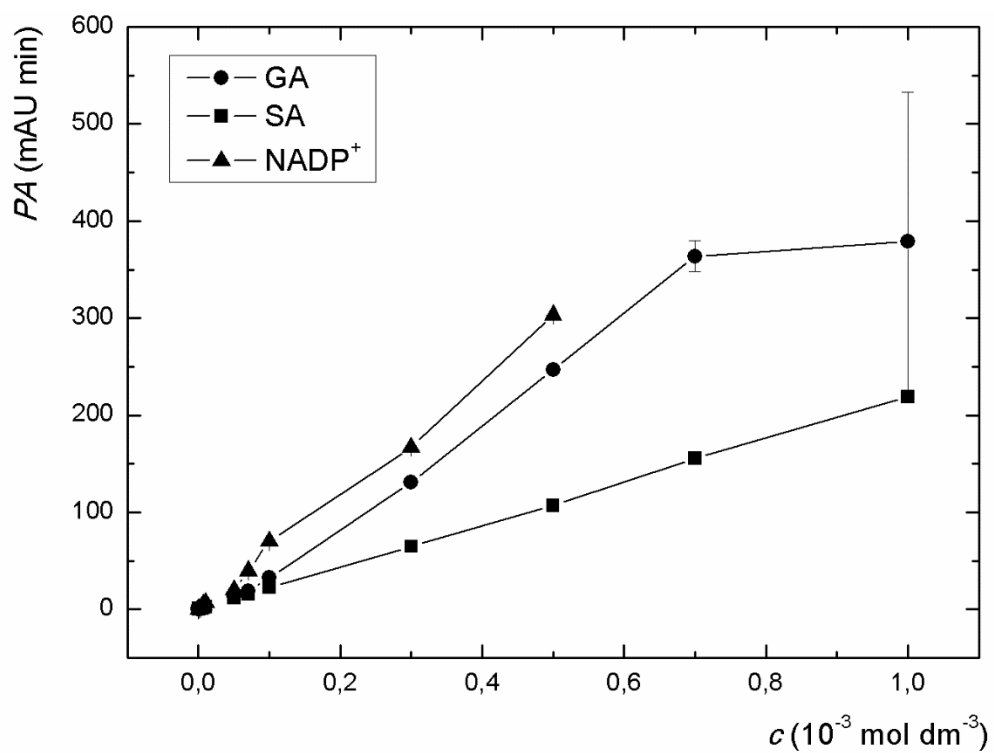
Obr. 4.7 Chromatogram roztoku standardů SA, NADP⁺ a GA separovaných za zvolených podmínek kolonou Hypercarb

Pík 1 – SA, pík 2 – NADP⁺, pík 3 – GA, za pomlčkou jsou retenční časy.

$c_{SA} = 4,70 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{NADP} = 6,70 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{GA} = 4,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; pH_{FP} = 3,00;
 $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ FP} : \text{CH}_3\text{CN} = 70 : 30 \%$; $\nu = 0,800 \text{ ml min}^{-1}$; $V_d = 20 \text{ } \mu\text{l}$; $T_{kolona} = 30 \text{ } ^\circ\text{C}$;
 $\lambda = 212 \text{ nm}$

4.3.2 Kalibrační závislost

Byly připraveny kalibrační roztoky v rozmezí od $5,00 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ jak pro gallovou kyselinu, tak i pro šikimovou kyselinu, pro NADP⁺ v rozmezí od $1,00 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ do $5,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Pro všechny tři analyty byly změřeny a z ploch píků sestrojeny kalibrační závislosti (Obr. 4.8) a také byly určeny jejich lineární úseky (Obr. 4.9) a další parametry metody stanovení, které jsou uvedené v Tab. 4.6.



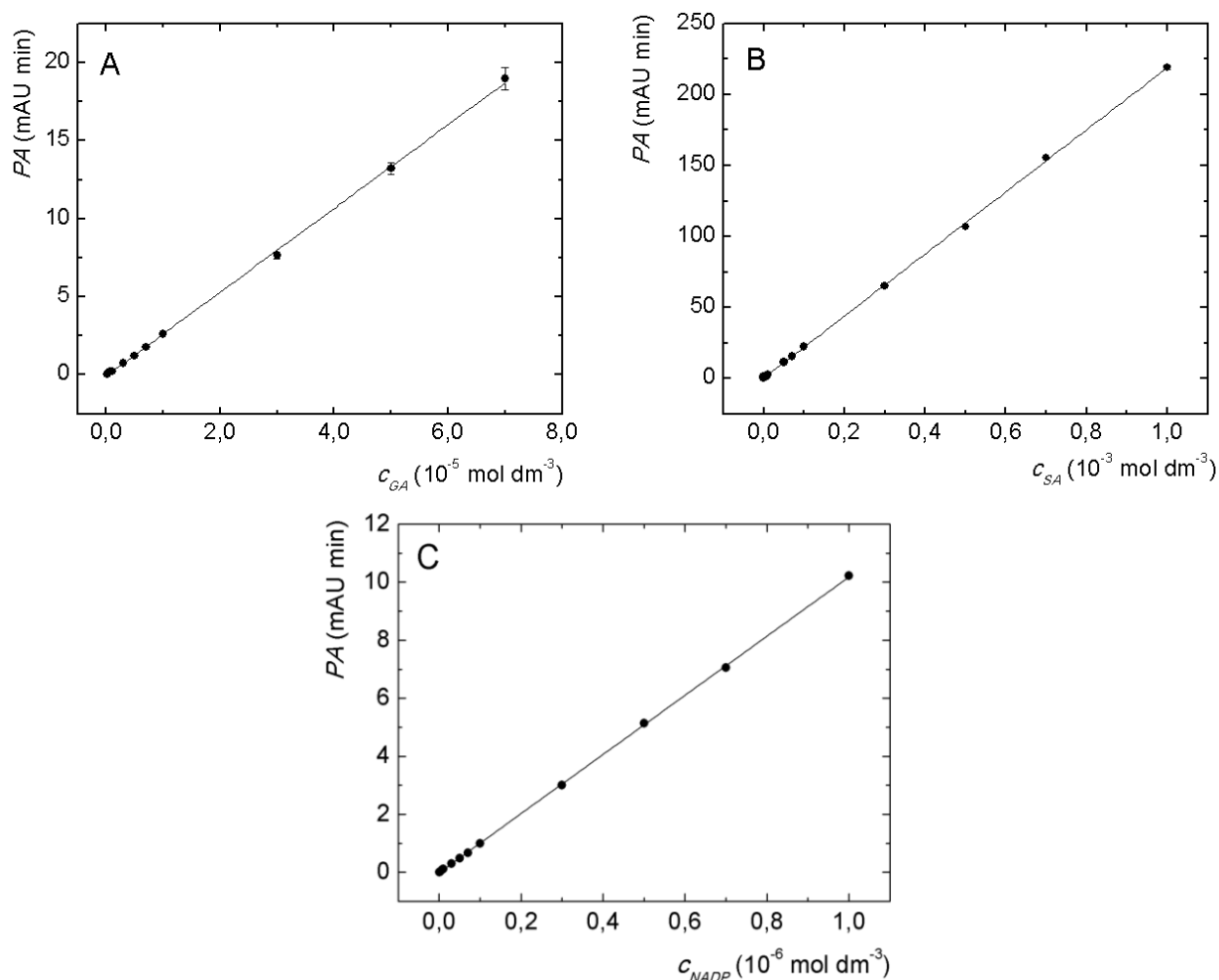
Tab. 4.6 Charakteristiky metody stanovení kolonou Hypercarb

parametr	SA	GA	NADP ⁺ _{212nm}
R	0,999	0,999	0,999
citlivost ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	$2,2 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$
opakovatelnost (%)	0,75	1,06	0,97
LDR (mol dm^{-3})	$1,5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-7} - 7 \cdot 10^{-5}$	$4,0 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-6}$
LOD (mol dm^{-3})	$4,4 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-9}$
LOQ (mol dm^{-3})	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$3,9 \cdot 10^{-7}$	$4,0 \cdot 10^{-9}$

Obr. 4.8 Kalibrační závislosti ploch píků GA, SA a NADP⁺ pro kolonu Hypercarb

0,1 mol dm⁻³ FP : CH₃CN = 70 : 30 %; pH_{FP} = 3,00; ν = 0,800 ml min⁻¹; V_d = 20 μ l; T_{vzorky} = 15 °C

T_{kolona} = 30 °C; λ = 212 nm



Obr. 4.9 Lineární úseky kalibračních závislostí ploch píků A: GA, B: SA a C: NADP⁺ pro kolonu Hypercarb

0,1 mol dm⁻³ FP : CH₃CN = 70 : 30 %; pH_{FP} = 3,00; ν = 0,800 ml min⁻¹; V_d = 20 μ l; T_{vzorky} = 15 °C;

T_{kolona} = 30 °C; λ = 212 nm

Parametry, u kterých není uvedeno jinak, jsou vypočítány z vyhodnocených ploch píků. Korelační koeficient je pro všechny tři analyty větší nebo roven 0,9990, což prokazuje vysokou shodu naměřených dat s vypočítanou rovnicí přímky. Citlivost metody je taktéž pro dané látky srovnatelná, nejcitlivější je pro gallovou kyselinu. Opakovatelnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou je pro šikimovou kyselinu 0,75 % a pro gallovou kyselinu a NADP⁺ je

srovnatelná okolo 1 %. Hodnoty relativní směrodatné odchylky jsou pro kolonu Hypercarb větší než v případě kolony C18. S kolonou Hypercarb však lze dosáhnout výrazně nižších mezí detekce a stanovitelnosti, a to až o 2 řády, pokud se porovnají experimentálně naměřené hodnoty. Výpočet těchto parametrů byl však i v tomto případě nesnadný. Meze detekce a stanovitelnosti vypočítané ze střední hodnoty chyby proložení lineárního úseku kalibrace přímkou jsou i v tomto případě poněkud vyšší, než byly reálné naměřené hodnoty, výpočet těchto limitů s použitím šumu základní linie více odpovídá realitě.

4.4 Analýza vzorků

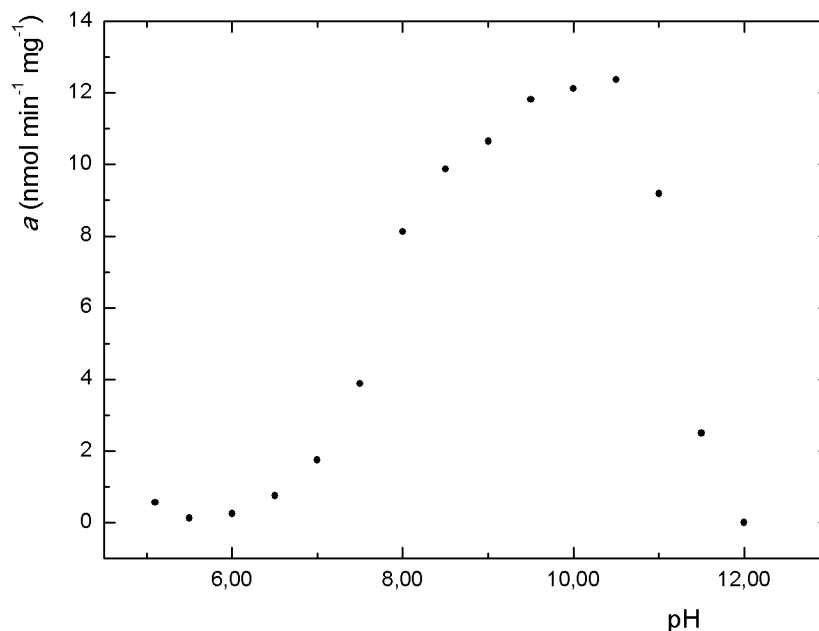
4.4.1 První set vzorků

První set reakčních směsí (složení viz Tab. 3.1) byl připraven 5. 5. 2016 po dokončení optimalizace metody stanovení s použitím kolony C18. Optimalizace metody s použitím kolony Hypercarb byla z důvodu dlouhé dodací lhůty započata až v listopadu 2016 a byla dokončena v únoru 2017, a proto mezi měřeními vzorků na obou kolonách je dlouhé časové období.

První set vzorků byl na koloně C18 analyzován bezprostředně po přípravě vzorků. Každý vzorek byl měřen 3x. U většiny vzorků byly pozorovány 2 píky, jeden společný pro šikimovou kyselinu s NADP^+ a druhý odpovídal jak retenčním časem, tak UV spektrem gallové kyselině. V žádném slepém vzorku se nenacházel pik gallové kyseliny. To dokazuje, že reakce proběhla podle očekávání a petrželová SDH katalyzuje reakci i za laboratorních podmínek.

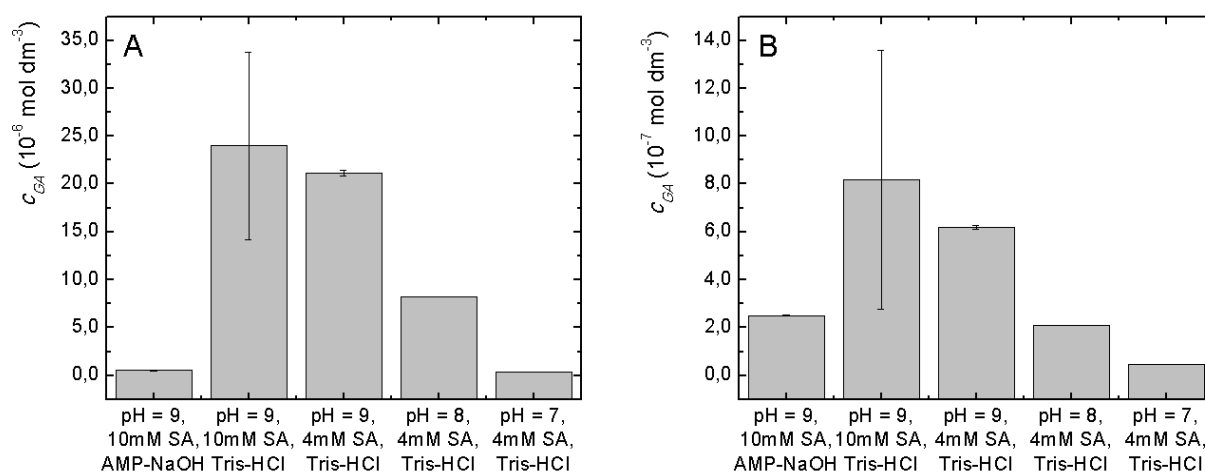
Nejvíce gallové kyseliny vzniklo v prostředí Tris-HCl pufru o pH 9 jak při inkubaci 15 min, tak při inkubaci 20 hodin, nicméně 20hodinová inkubace vykazovala vyšší výtěžek GA a to o 97 %. Koncentrace šikimové kyseliny měla také vliv na výtěžek reakce. Ve vzorku obsahujícím $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ SA vzniklo o 20 % více gallové kyseliny než ve vzorku o koncentraci SA $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Množství vzniklé gallové kyseliny také odpovídalo závislosti aktivity SDH na pH pufru, kdy její aktivita se snižujícím se pH klesá (viz Obr. 4.10). Významný rozdíl ve výtěžku reakce byl také pozorován při použití různých pufrů. Ačkoliv by AMP-NaOH měl být pro aktivitu enzymu vhodnější, pik gallové kyseliny byl velmi malý. Na Obr. 4.11 je zobrazena závislost koncentrace gallové kyseliny na složení jednotlivých reakčních směsí, na Obr. 4.12 je obdobně zobrazen poměr koncentrací gallové kyseliny a šikimové kyseliny a na Obr. 4.13 je zobrazeno porovnání ploch šikimové kyseliny ve vzorku a slepém vzorku. Na něm je jasně patrný pokles

plochy šikimové kyseliny po proběhnutí reakce. Při pH 7 reakce prakticky neprobíhá a rozdíl v plochách píků je dán zřejmě jen biologickou a chemickou variabilitou. I informace o velikosti jejich vlivu je však velmi důležitá, aby z těchto grafů nebyly vyvozovány irelevantní závěry.



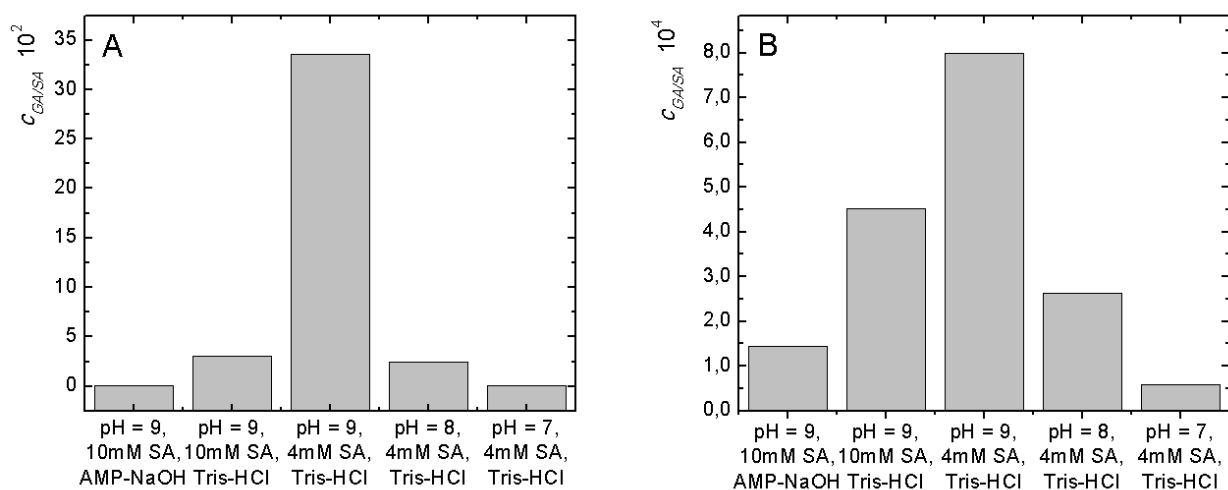
Obr. 4.10 Graf závislosti specifické aktivity SDH na pH [99]

1 ml vzorku obsahoval: $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ SA, $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ NADP⁺, 50 μl enzymatického preparátu, 400 μl Tris-HCl pufru o daném pH



Obr.4.11 Graf závislosti koncentrace GA na složení reakční směsi separované na koloně C18, A: inkubace 20 hod., B: inkubace 15 min

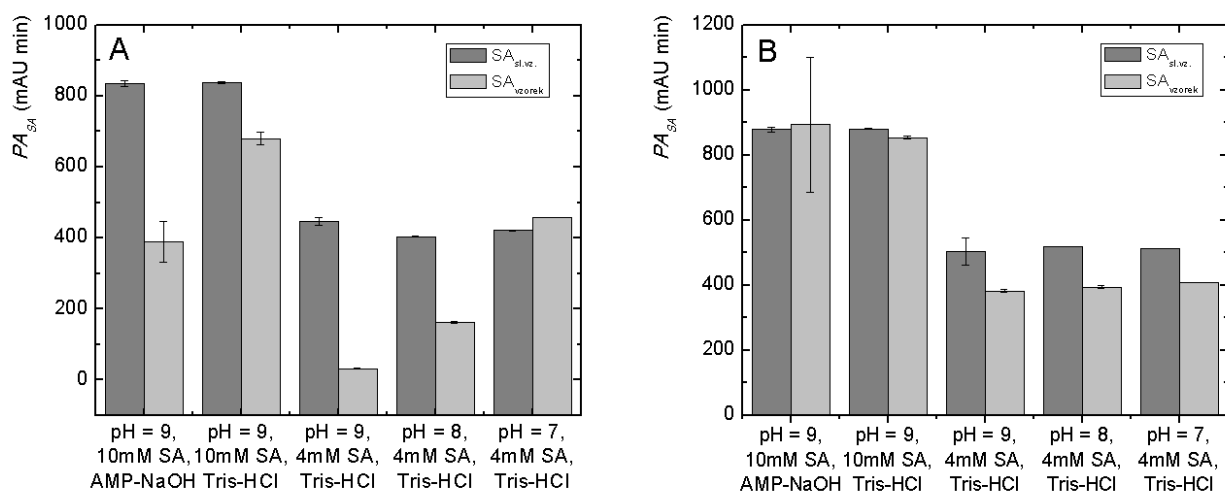
Podmínky separace viz Tab. 4.1



Obr. 4.12 Graf závislosti poměru koncentrace GA ku koncentraci SA na složení reakční směsi separované na koloně C18,

A: inkubace 20 hod., B: inkubace 15 min,

Podmínky separace viz Tab. 4.1



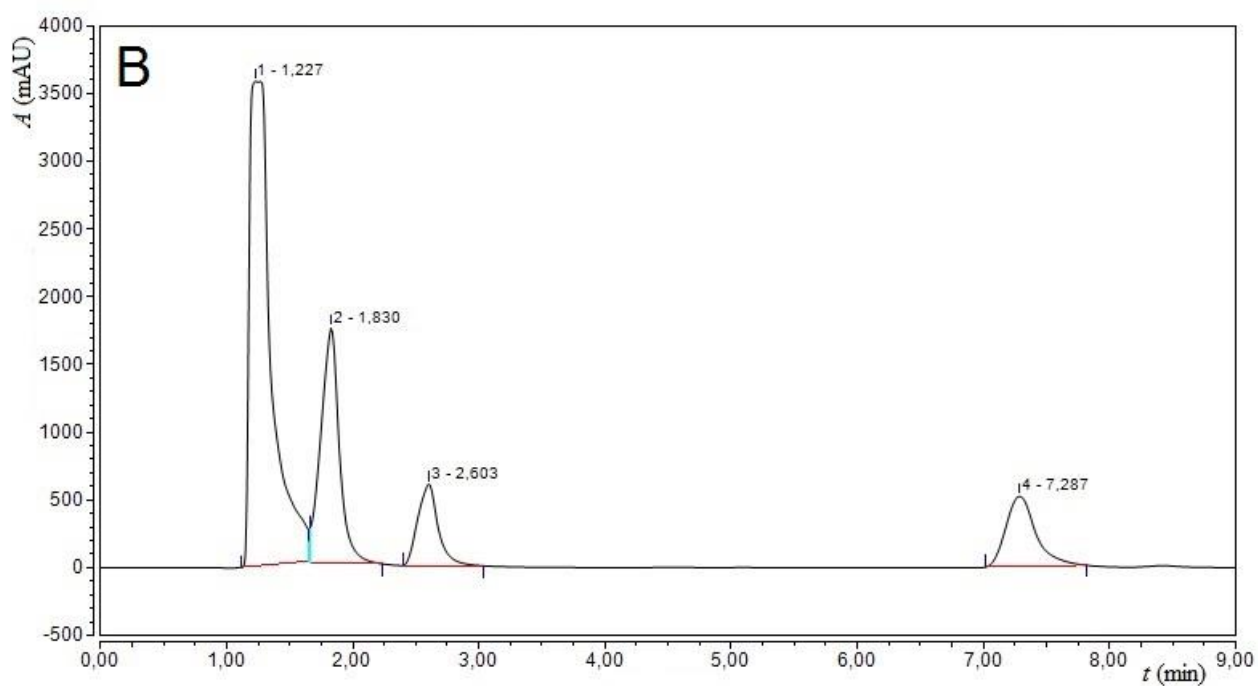
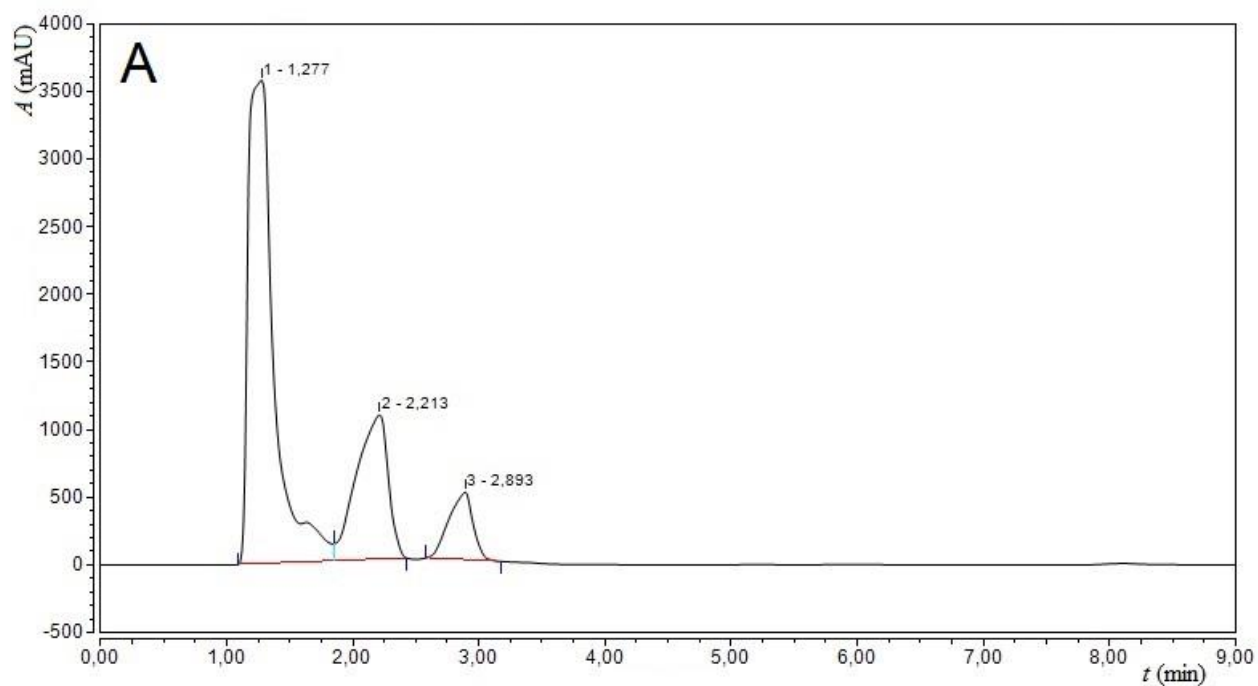
Obr. 4.13 Graf porovnání ploch píků SA ve vzorcích a slepých vzorcích při různých složeních reakčních směsí separovaných na koloně C18, podmínky separace viz Tab. 4.1.

A: inkubace 20 hod., B: inkubace 15 min

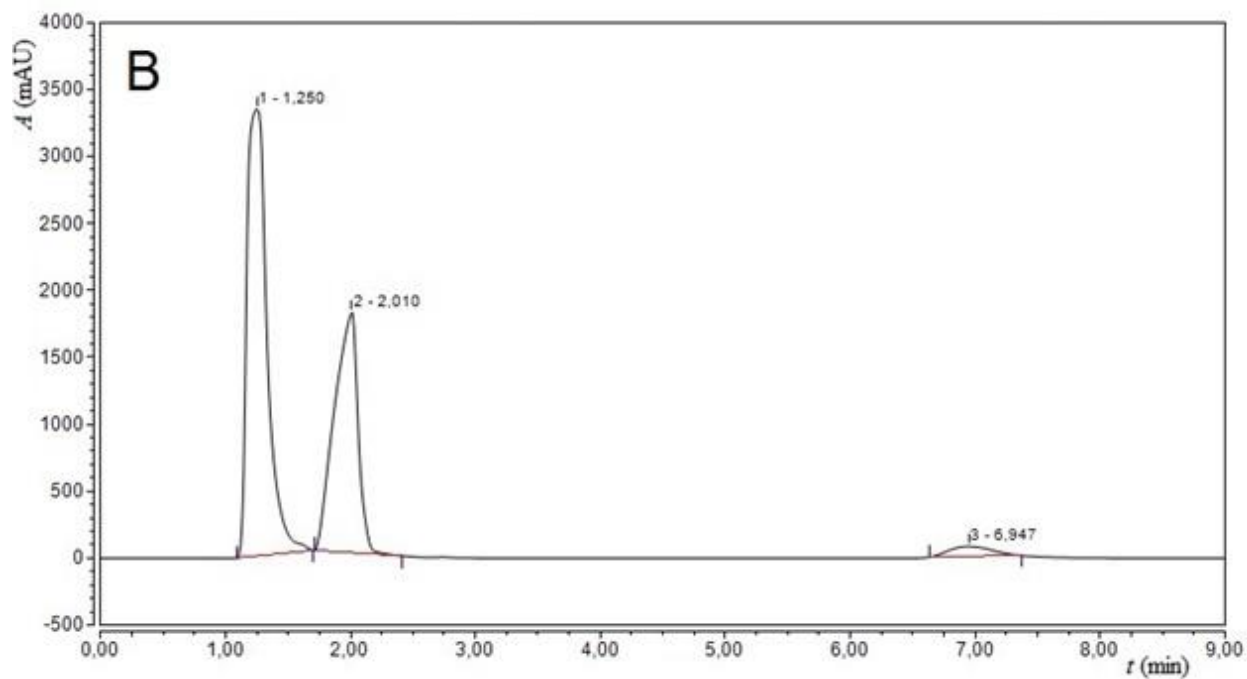
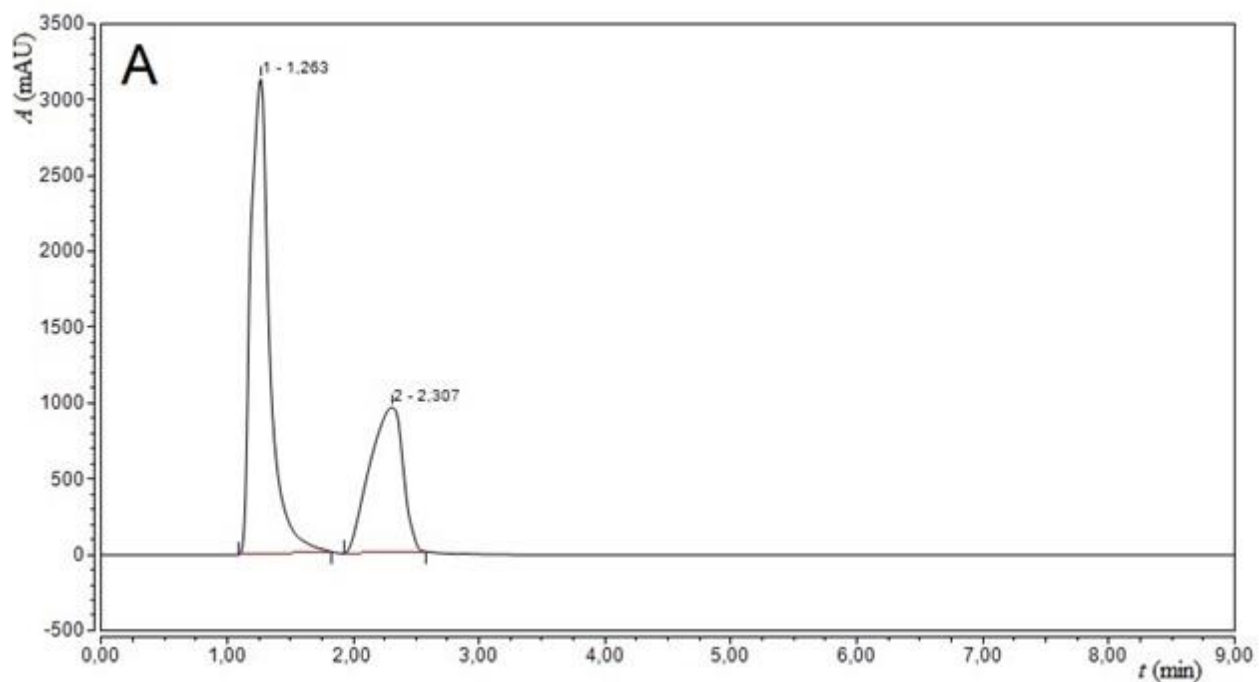
Po provedení optimalizace pro měření s kolonou Hypercarb byly vzorky 1 – 16 na této koloně taktéž analyzovány, každý vzorek a jeho slepý vzorek byly měřeny třikrát. Ukázalo se, že tyto reakční směsi nejsou po dlouhou dobu 9 měsíců v mrazáku stabilní. U žádné z nich se na chromatogramu neukázal pík gallové kyseliny, u některých chromatogramů vzorků se nicméně objevil pík, který svým retenčním časem neodpovídal žádnému ze standardů, a jedná se zřejmě o nějaký meziprodukt či jiný produkt reakce, protože v příslušných slepých vzorcích se nevyskytoval. Chromatogramy proto nebyly integrovány, ale byly pouze porovnány pouhým subjektivním zhodnocením tvaru píků a jejich míry rozdělení, aby nové vzorky, které bylo potřeba připravit, mohly mít co nejvhodnější složení pro analýzu na koloně Hypercarb. Ta se na základě separace modelových vzorků jevila pro měření vhodnější než kolona C18, protože došlo k separaci všech tří analytů s dostatečným rozlišením a meze detekce a stanovitelnosti jsou nižší.

U vzorků 1, 2, 5 a 6 (Tris-HCl pufr o pH 9) nedošlo k dostatečnému rozdělení šikimové kyseliny a NADP^+ , zřejmě zde vznikl asociát, u NADP^+ byl dále pozorován tzv. tailing píku, meziprodukt zde pozorován nebyl. U vzorku 7 (Tris-HCl pufr o pH 8) byl pozorován meziprodukt ihned za píkem NADP^+ , u slepého vzorku byl ale pík NADP^+ širší a zasahoval až do retenčního času meziproduktu. V reakční směsi tedy zřejmě dochází ke vzniku asociátu NADP^+ a meziproduktu. U vzorku 8 (Tris-HCl pufr o pH 7) byl pozorován malý pík NADP^+ a poměrně velký pík meziproduktu, který měl ovšem jiný retenční čas než meziprodukt u vzorku 7. Na rozdíl od ostatních vzorků zde se u NADP^+ objevil tzv. fronting píku. Nejlepší výsledek analýzy byl u vzorků 3 a 4 (AMP-NaOH pufr o pH 9), kde došlo téměř k úplnému rozdělení šikimové kyseliny a NADP^+ , pík NADP^+ byl úzký a byl zde také pozorován pík meziproduktu, který byl úplně oddělený od píku NADP^+ . Složení vzorků 3 a 4 se stalo tedy výchozím pro složení druhého setu vzorků. Chromatogramy vzorků 9 – 16 (inkubace 15 min) se nelišily od chromatogramů jejich slepých vzorků. Protože reakce probíhala kratší dobu, vzniklo menší množství produktů, které nebylo dostatečné, aby nedošlo během doby uskladnění k degradaci veškeré GA.

Se vzorkem 3 bylo dále pracováno. Aby bylo jasné, zda se retenční čas píku gallové kyseliny ve vzorku nebude lišit od retenčního času této látky ve standardním roztoku bez přítomnosti matrice, byl ke 100 μl vzorku 3 a jeho slepému vzorku (50 μl reakční směsi a 50 μl 30% acetonitrilu) přidán přídatek 30 μl $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztoku standardu gallové kyseliny. Chromatogramy vzorku, vzorku s přídatkem slepého vzorku a slepého vzorku s přídatkem jsou zobrazeny na Obr. 4.14 a Obr. 4.15.



Obr.4.14 Chromatogramy vzorku 3, A: bez přídavku, B: přídavek 30 μl $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ GA měřeného kolonou Hypercarb
Podmínky separace viz Tab. 4.4.



Obr 4.15 Chromatogramy vzorku 3, A: slepý vzorek, B: slepý vzorek s přidavkem $30\ \mu\text{l}$ $1 \cdot 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ GA měřeného kolonou Hypercarb
Podmínky separace viz Tab. 4.4.

4.4.2 Druhý set vzorků

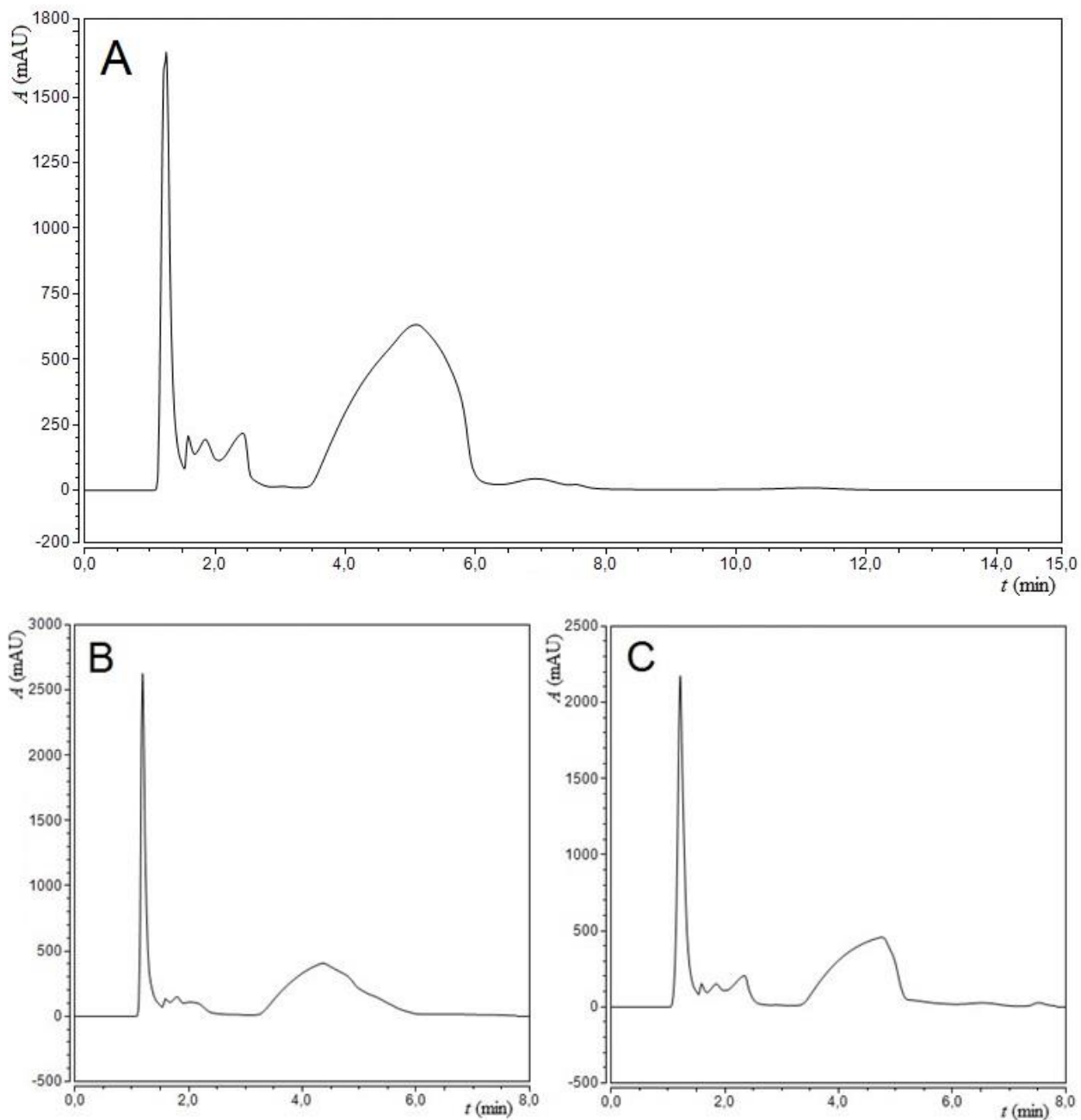
Vzorky druhého setu (složení viz Tab. 3.2) byly připravovány postupně, ihned měřeny a jejich složení se odvíjelo od výsledků předchozích analýz. Pro měření byla používána kolona Hypercarb, na základě výsledků předchozích experimentů s modelovou směsí látek, protože v ní docházelo k rozdělení šikimové kyseliny a NADP^+ , k separaci meziproduktů reakce a bylo možné dosáhnout nižšího limitu detekce.

Jako první byly připraveny vzorky 17 a 18. Vzorek 17 obsahoval vyšší koncentraci šikimové kyseliny, při ředění reakční směsi 30% acetonitrilem v poměru 1:1, tak jako u vzorků v prvním setu, došlo k překročení rozsahu detektoru. Vzhledem k tomu, že šikimová kyselina byla v reakční směsi ve velkém nadbytku, bylo možné její koncentraci snížit a vyhnout se tak většímu ředění při přípravě vzorku. Dále byl tedy vyhodnocován pouze vzorek 18. Chromatogramy obsahovaly vysoký a úzký pík šikimové kyseliny ve správném retenčním čase, ovšem v retenčním čase NADP^+ se neobjevil žádný pík a v čase, kde měly být píky meziproduktů a gallové kyseliny, se objevilo několik rozmytých nízkých píků. Při opakovaných měřeních se chromatogramy pokaždé lišily. Přes veškerou snahu se proto látky ve vzorcích 17 a 18 nepodařilo stanovit.

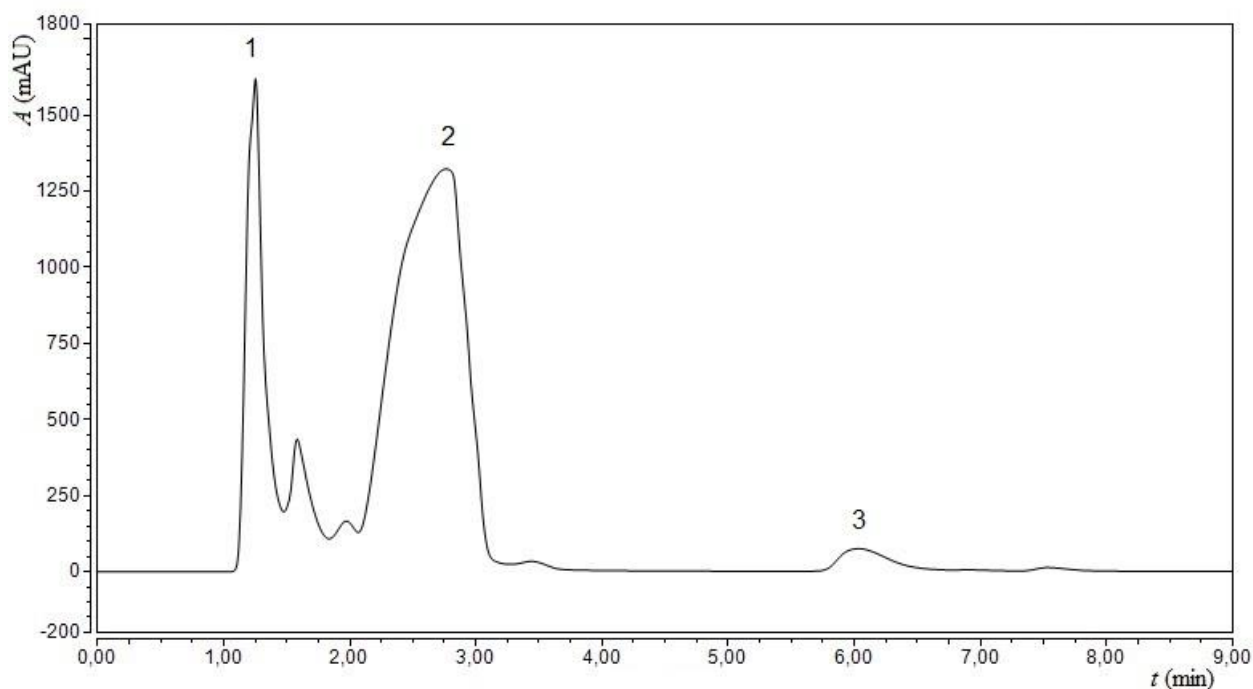
Kvůli tomu se přistoupilo k prověření správnosti volby pufrů reakční směsi (vzorky 19, 20 a 21). Z chromatogramů na Obr. 4.16 vyplývá, že nejvhodnějším pufrům je opravdu AMP-NaOH, protože plocha píku šikimové kyseliny je zde nejmenší, což znamená, že reakce proběhla nejúčinněji. Za píkem šikimové kyseliny jsou 3 další malé neidentifikované píky, zřejmě meziprodukty, a v čase přibližně 5 min se objevil široký pík NADP^+ s pro něj typickým tzv. frontingem. V čase přibližně 7 min se objevil malý rozmytý pík, který patří gallové kyselině.

Protože aktivita enzymu s každým dnem klesala, byly připraveny vzorky 22 – 35 a změřeny. Vzorek 22 byl měřen opakovaně s jednodenním rozestupem. Došlo ke zřetelnému snížení výšky píku šikimové kyseliny, objevení dalšího meziproduktu, zvětšení píku NADP^+ , objevení malého píku v retenčním čase gallové kyseliny a zmizení širokého rozmytého píku - zřejmě asociátu NADP^+ s meziprodukty a gallovou kyselinou. Vzhledem k tomu, že nebylo možné identifikovat jednotlivé píky s látkami, byl vzorek 22 spikován jednotlivými standardy a z nárůstu výšky a plochy jednotlivých píků byly jednoznačně určeny, jak ukazuje Obr. 4.17. Vzorky obsahující přídavek kvercetinu nebylo vůbec možné vyhodnotit, protože kvercetin se při vysokém pH rozpadá, tvoří velké množství píků, které překrývají další produkty. Z tohoto měření vyplývá,

že kolona Hypercarb není vhodná pro vyhodnocení výsledku reakce, bylo by ji však možné využít pro studium průběhu reakce.



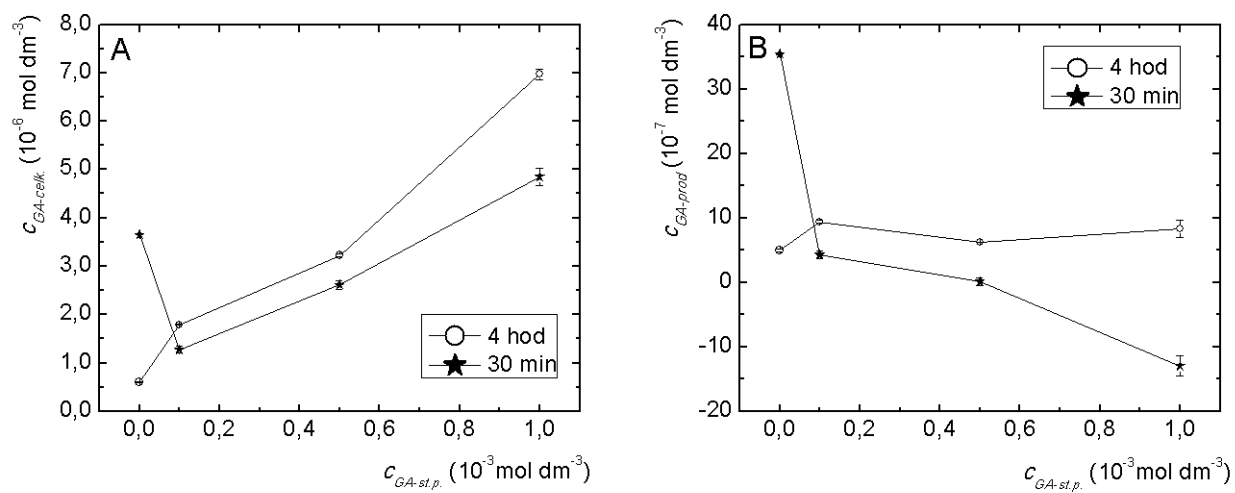
Obr. 4.16 Chromatogramy vzorků obsahují různé pufrы – A: vzorek 19 – AMP-NaOH, B: vzorek 20 – Tris-HCl, C: vzorek 21 – glycin-NaOH měřené kolonou Hypercarb
Podmínky separace viz Tab. 4.4.



Obr. 4.17 Chromatogram spikovaného vzorku 22 měřeného kolonou Hypercarb

Pík 1 – SA, pík 2 – NADP^+ , pík 3 – GA, podmínky separace viz Tab. 4.4.

Vzorky 22 – 35, kromě těch, ve kterých byl přídavek kvercetinu, byly poté měřeny i s kolonou C18. U těchto vzorků měl být zkoumán vliv přídavku gallové kyseliny nebo kvercetinu do reakční směsi na množství vzniklé gallové kyseliny. Cílem bylo zjistit, zda gallová kyselina nebo kvercetin působí jako inhibitor reakce. Všechny chromatogramy obsahovaly společný pík pro šikimovou kyselinu a NADP^+ , 2 píky meziproductů a pík gallové kyseliny. Z rozdílu koncentrací vypočítaných z ploch píků gallové kyseliny ve vzorku a slepém vzorku byla vypočítána koncentrace vzniklé gallové kyseliny. Závislost koncentrace veškeré gallové kyseliny a pouze vzniklé gallové kyseliny na koncentraci přídavku gallové kyseliny je zobrazena na Obr. 4.18. Pro určení průběhu závislosti by bylo nutné opět znát odchylky hodnot způsobené přípravou reakčních směsí, biologickou a chemickou variabilitou. Tato celková variabilita totiž zřejmě významně převyšuje vyhodnocované signály.



Obr. 4.18 Závislost A: celkové koncentrace GA a B: koncentrace vzniklé GA na koncentraci přídatku GA měřené na koloně C18

Podmínky separace viz Tab. 4.1.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byl vývoj jednoduché HPLC metody pro stanovení gallové kyseliny jako možného produktu enzymatické reakce, kde výchozími látkami reakce jsou šikimová kyselina, NADP^+ a enzym šikimátdehydrogenasa (SDH) extrahovaný z petržele. Sledovány byly především gallová kyselina a šikimová kyselina. Z důvodu vyhodnocení koncentrace šikimové kyseliny pak i NADP^+ .

Byly vyvinuty dokonce dvě metody stanovení. První s použitím běžně používané kolony s chemicky vázaným oktadecylem a druhá využívající kolony Hypercarb s grafitovým uhlíkem. Pro obě stanovení byla použita UV detekce.

Pro obě kolony bylo optimalizováno složení mobilní fáze (koncentrace fosfátového pufru, pH jeho vodného roztoku a poměr k acetonitrilu), průtoková rychlost mobilní fáze, dávkovaný objem, vyhřívání kolony a vlnová délka detekce jednotlivých složek modelové směsi. Protože na koloně C18 nedošlo k rozdělení šikimové kyseliny a NADP^+ , byla vyhodnocována plocha společného píku při 212 nm, kde absorbují obě látky, a při 260 nm, kde absorbovalo pouze NADP^+ . Vyhodnocená plocha píku NADP^+ při 260 nm byla pomocí kalibračních závislostí přepočítána na teoretickou plochu píku při 212 nm. Tato vypočítaná plocha píku byla poté odečtena od společné plochy píku šikimové kyseliny a NADP^+ a tím byla určena i samotná plocha píku šikimové kyseliny. Plocha píku gallové kyseliny byla vyhodnocována při 212 nm. Pro každý analyt byla naměřena kalibrační závislost a byly vypočítány příslušné charakteristiky jeho stanovení. Nejvyšší citlivosti a také nižší meze detekce a to $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ bylo dosaženo pro stanovení NADP^+ , avšak rozlišení píků šikimové kyseliny a NADP^+ nebylo uspokojivé.

Z tohoto důvodu byla zakoupena a používána i kolona Hypercarb. Po obdobné optimalizaci jako v případě kolony C18 byla opět z ploch píků pro každý analyt změřena kalibrační závislost a byly vypočítány příslušné charakteristiky stanovení. V tomto případě byla při použití modelových vzorků nejvyšší citlivost získána pro stanovení gallové kyseliny, avšak nejnižší meze detekce bylo dosaženo opět pro NADP^+ a to $1,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Přestože obě vyvinuté metody měly pro požadovaný účel vhodné parametry (lineární dynamický rozsah, rozlišení píků apod.) při měření modelových vzorků, se stanovením gallové i šikimové kyseliny a NADP^+ v enzymatických reakčních směsích byly získávány chromatogramy, které se značně lišily od očekávaných záznamů.

Na katedře biochemie byly v rámci řešení projektu UNCE 204025/2012 připraveny dva sady enzymatických reakčních směsí, které byly měřeny jako reálné vzorky. První set obsahoval 16 vzorků, které se lišily složením a délkou inkubace. Cílem bylo nejprve dokázat vznik gallové kyseliny z šikimové kyseliny v přítomnosti NADP^+ a šikimátdehydrogenasy (SDH) a určit nejvhodnější složení reakční směsi pro největší výtěžek gallové kyseliny. Ze získaných výsledků vyplývá, že gallová kyselina vznikla alespoň v minimální míře v každé reakční směsi a jako nejvhodnější složení se pro stanovení na koloně C18 jeví Tris-HCl pufr o pH 9, $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ nebo $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ šikimová kyselina, $50 \mu\text{l}$ $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ enzymu SDH a doba inkubace 20 hodin. Měření s kolonou Hypercarb prokázalo, že gallová kyselina v reakční směsi časem degraduje, protože nebyla nalezena v žádném vzorku, namísto ní se však objevily jiné produkty. Vzorky byly vyhodnoceny pouze subjektivním porovnáním tvaru píků, jako nejlepší se pro stanovení na této koloně jevila reakční směs složená z AMP-NaOH pufru o pH 9, $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ šikimová kyselina, $50 \mu\text{l}$ $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ enzymu SDH s dobou inkubace 20 hodin. Ke vzorku s tímto složením byl přidán přírůstek gallové kyseliny pro ověření, zda se v reakční směsi chová stejně jako v modelovém vzorku.

Složení vzorků druhého setu se odvíjelo od předpokladu, že pro měření vzorků je kolona Hypercarb vhodnější než kolona C18. Měření vzorků 17 – 24 však ukázalo, že se složení reakční směsi v čase mění, vznikají a opět zanikají asociáty NADP^+ s gallovou kyselinou a dalšími produkty, popř. meziprodukty. Bylo ověřeno, že pufr AMP-NaOH o pH 9 je nejvhodnější pro reakci, protože došlo k největšímu úbytku šikimové kyseliny. Další vzorky proto byly měřeny opět kolonou C18. Cílem této série vzorků bylo zjištění, zda gallová kyselina a kvercetin působí jako inhibitory sledované enzymatické reakce. Z rozdílů koncentrací gallové kyseliny ve vzorku a slepém vzorku byla vypočítána koncentrace vzniklé gallové kyseliny. Biologická, chemická variabilita i variabilita přípravy reakčních směsí však významně převyšuje vyhodnocované signály.

Z výsledků měření reálných vzorků vyplývá, že každá metoda stanovení je vhodná pro jiný účel. Kolona C18 je vhodná pro vyhodnocení výsledku reakce i v krátké době po zastavení enzymatické reakce, dochází k menšímu rozmytí píku gallové kyseliny a umožňuje kratší dobu analýzy. Její výhodou je také fakt, že se jedná o typ kolony, který je běžně využíván k velkému množství aplikací. Na druhou stranu je nutno provádět vyhodnocení při dvou různých vlnových délkách a z kalibrační závislosti dopočítávat koncentrace šikimové kyseliny a NADP^+ . Má přibližně o řád vyšší meze detekce a stanovitelnosti pro všechny analyty. Kolona Hypercarb není

vhodná pro kvantitativní vyhodnocení výsledku reakce, ale bylo by ji možné využít pro studium průběhu reakce, což dává možnost pro hlubší zkoumání této problematiky.

Značnou překážkou ve vyhodnocování je biologická variabilita, popř. variabilita přípravy reakčních směsí, kdy se plochy píků jednotlivých analytů ve dvou paralelně připravených vzorcích lišily až o 20 %. Z takového rozptylu lze s jistotou určit, zda daný analyt je přítomný ve vzorku, ale nelze s jistotou určit průběh závislosti jako zde při studiu inhibice reakce přítomnou gallovou kyselinou. Možnost, jak eliminovat tento vliv, je připravit reakční směs ve větším objemu a rozdělit ji na jednotlivé vzorky těsně před přidáním enzymu a připravit velké množství vzorků, aby bylo možné statistickými metodami vyloučit odlehlé výsledky.

Pro identifikaci ostatních produktů, popř. meziproduktů a asociátů vznikajících v průběhu enzymatické reakce by bylo možno využít hmotnostní spektrometrie, avšak toto je nad rámec této diplomové práce.

6 LITERATURA

- [1] Dey, T. B.; Chakraborty, S.; Jain, K. K.; et al.: : Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends Food Sci Technol* **53**, 60–74 (2016).
- [2] Peterson, D. M.: : Oat Antioxidants. *J Cereal Sci* **33**:2, 115–129 (2001).
- [3] Martin, K. R.; Appel, C. L.: : Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutr Diet Suppl* **2**, 1–12 (2010).
- [4] Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; et al.: : Bioavailability, Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727–747 (2004).
- [5] Dixon, R. A.; Paiva, N. L.: : Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell Online* **7**:7, 1085–1097 (1995).
- [6] Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G.: : Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**:7, 933–956 (1996).
- [7] Rice-Evans, C. A.; Miller, N.; Paganga, G.: : Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* **2**:4, 152–159 (1997).
- [8] Daglia, M.: : Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* **23**:2, 174–181 (2012).
- [9] Jabbari, M.: : Solvent dependence of protonation equilibria for gallic acid in water and different acetonitrile-water cosolvent systems. *J Mol Liq* **208**, 5–10 (2015).
- [10] Pinho, E.; Soares, G.; Henriques, M.: : Cyclodextrin modulation of gallic acid in vitro antibacterial activity. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **81**, 205–214 (2015).
- [11] Yen, G.-C.; Duh, P.-D.; Tsai, H.-L.: : Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem* **79**:3, 307–313 (2002).
- [12] Kim, Y.-J.: : Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol Pharm Bull* **30**:6, 1052–1055 (2007).
- [13] Heleno, S. A.; Martins, A.; Queiroz, M. J. R. P.; Ferreira, I. C. F. R.: : Bioactivity of

- phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem* **173**, 501–513 (2015).
- [14] Nakagawa, Y.; Tayama, S.: : Cytotoxicity of propyl gallate and related compounds in rat hepatocytes. *Arch Toxicol* **69**:3, 204–208 (1995).
- [15] Inoue, M.; Suzuki, R.; Sakaguchi, N.; et al.: : Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull* **18**:11, 1526–1530 (1995).
- [16] Locatelli, C.; Rosso, R.; Santos-Silva, M. C.; et al.: : Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg Med Chem* **16**:7, 3791–9 (2008).
- [17] Kaur, M.; Velmurugan, B.; Rajamanickam, S.; et al.: : Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharm Res* **26**:9, 2133–2140 (2009).
- [18] Lu, Y.; Jiang, F.; Jiang, H.; et al.: : Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol* **641**, 102–107 (2010).
- [19] Kratz, J. M.; Andrighetti-Fröhner, C. R.; Leal, P. C.; et al.: : Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol Pharm Bull* **31**, 903–907 (2008).
- [20] Werner, I.; Bacher, A.; Eisenreich, W.: : Retrobiosynthetic NMR Studies with ¹³C-Labeled Glucose. Formation of Gallic Acid in Plants and Fungi. *J Biol Chem* **272**:41, 25474–25482 (1997).
- [21] Ossipov, V.; Salminen, J.-P.; Ossipova, S.; et al.: : Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochem Syst Ecol* **31**:1, 3–16 (2003).
- [22] Muir, R. M.; Ibáñez, A. M.; Uratsu, S. L.; et al.: : Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Mol Biol* **75**:6, 555–565 (2011).
- [23] Maeda, H.; Dudareva, N.: : The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 73–105 (2012).
- [24] Salamon, I. I.; Davis, B. D.: : Aromatic biosynthesis. IX. The isolation of a precursor of

- shikimic acid. *J Am Chem Soc* **75**, 5567–5571 (1953).
- [25] Fukuta, Y.; Mita, T.; Fukuda, N.; et al.: : De novo synthesis of tamiflu via a catalytic asymmetric ring-opening of meso-aziridines with TMSN₃. *J Am Chem Soc* **128**, 6312–6313 (2006).
- [26] Radwanski, E. R.; Last, R. L.: : Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* **7**, 921–934 (1995).
- [27] Kutchan, T. M.: : Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *Plant Cell* **7**:July, 1059–1070 (1995).
- [28] Vogt, T.: : Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* **3**:1, 2–20 (2010).
- [29] Pribat, A.; Noiriel, A.; Morse, A. M.; et al.: : Nonflowering plants possess a unique folate-dependent phenylalanine hydroxylase that is localized in chloroplasts. *Plant Cell* **22**:10, 3410–3422 (2010).
- [30] Razal, R. A.; Ellis, S.; Singh, S.; et al.: : Nitrogen recycling during phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry* **41**:1, 31–35 (1996).
- [31] Wakasa, K.; Ishihara, A.: : Metabolic engineering of the tryptophan and phenylalanine biosynthetic pathways in rice. *Plant Biotechnol* **26**:5, 523–533 (2009).
- [32] Galili, G.; Höfgen, R.: : Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. *Metab Eng* **4**:1, 3–11 (2002).
- [33] Fernstrom, J. D.; Fernstrom, M. H.: : Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr* **137**:6, 1539S–1548S (2007).
- [34] Facchini, P. J.; Huber-Allanach, K. L.; Tari, L. W.: : Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: Evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry* **54**:2, 121–138 (2000).
- [35] Herrmann, K. M.: : The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* **7**, 907–919 (1995).
- [36] Schmid, J.; Amrhein, N.: : Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* **39**:4, 737–749 (1995).

- [37] Bentley, R.; Haslam, E.: : The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**:5, 307–384 (1990).
- [38] Rubin, J. L.; Jensen, R. A.: : Differentially Regulated Isozymes of 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate-7-Phosphate Synthase from Seedlings of *Vigna radiata* [L.] Wilczek. *Plant Physiol* **79**:3, 711–718 (1985).
- [39] Huisman, O. C.; Kosuge, T.: : Regulation of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Higher Plants. *J Biol Chem* **249**:21, 6842–6848 (1974).
- [40] Entus, R.; Poling, M.; Herrmann, K. M.: : Redox Regulation of Arabidopsis 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase. *Plant Physiol* **129**, 1866–1871 (2002).
- [41] Webby, C. J.; Baker, H. M.; Lott, J. S.; et al.: : The Structure of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a common catalytic scaffold and ancestry for type I and type II enzymes. *J Mol Biol* **354**:4, 927–939 (2005).
- [42] Görlach, J.; Raesecke, H.-R.; Rentsch, D.; et al.: : Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8, 3166–3170 (1995).
- [43] Keith, B.; Dongt, X.; Ausubelt, F. M.; Fink, G. R.: : Differential induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8821–8825 (1991).
- [44] Bender, S. L.; Mehdi, S.; Knowles, J. R.: : Dehydroquinate synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis. *Biochemistry* **28**:19, 7555–7560 (1989).
- [45] Srinivasan, P. R.; Rothschild, J.; Sprinson, D. B.: : The enzymic conversion of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic Acid 7-Phosphate to 5-Dehydroquinate. *J Biol Chem* **238**:10, 3176–3182 (1963).
- [46] Bischoff, M.; Schaller, A.; Bieri, F.; et al.: : Molecular Characterization of Tomato 3-Dehydroquinate Dehydratase-Shikimate : NADP Oxidoreductase. *Plant Physiol* **125**, 1891–1900 (2001).

- [47] Fiedler, E.; Schultz, G.: : Localization, purification, and characterization of shikimate oxidoreductase-dehydroquinase hydrolyase from stroma of spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **79**:1, 212–218 (1985).
- [48] Singh, S. A.; Christendat, D.: : Structure of Arabidopsis dehydroquinase dehydratase-shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway. *Biochemistry* **45**:25, 7787–7796 (2006).
- [49] Ding, L.; Hofius, D.; Hajirezaei, M. R.; et al.: : Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. *J Exp Bot* **58**:8, 2053–2067 (2007).
- [50] Fucile, G.; Garcia, C.; Carlsson, J.; et al.: : Structural and biochemical investigation of two Arabidopsis shikimate kinases: The heat-inducible isoform is thermostable. *Protein Sci* **20**:7, 1125–1136 (2011).
- [51] Gan, J.; Gu, Y.; Li, Y.; et al.: : Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase in complex with shikimic acid and an ATP analogue. *Biochemistry* **45**:28, 8539–8545 (2006).
- [52] Koshiba, T.: : Alicyclic acid metabolism in plants 12. Partial purification and some properties of shikimate kinase from Phaseolus mungo seedlings. *Plant Cell Physiol* **20**:4, 803–809 (1979).
- [53] Kasai, K.; Kanno, T.; Akita, M.; et al.: : Identification of three shikimate kinase genes in rice: Characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins. *Planta* **222**:3, 438–447 (2005).
- [54] Fucile, G.; Falconer, S.; Christendat, D.: : Evolutionary diversification of plant shikimate kinase gene duplicates. *PLoS Genet* **4**:12, 1–15 (2008).
- [55] Schönbrunn, E.; Eschenburg, S.; Shuttleworth, W. A.; et al.: : Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4, 1376–1380 (2001).
- [56] Klee, H. J.; Muskopf, Y. M.; Gasser, C. S.: : Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol Gen Genet MGG* **210**:3, 437–442

(1987).

- [57] Ferrari, S.; Galletti, R.; Denoux, C.; et al.: : Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT. *Plant Physiol* **144**:1, 367–379 (2007).
- [58] Nikiforova, V.; Freitag, J.; Kempa, S.; et al.: : Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: Interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J* **33**:4, 633–650 (2003).
- [59] Healy-Fried, M. L.; Funke, T.; Priestman, M. A.; et al.: : Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J Biol Chem* **282**:45, 32949–32955 (2007).
- [60] Funke, T.; Han, H.; Healy-Fried, M. L.; et al.: : Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:35, 13010–13015 (2006).
- [61] Smart, C. C.; Johanning, D.; Müller, G.; Amrhein, N.: : Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J Biol Chem* **260**:30, 16338–16346 (1985).
- [62] Macheroux, P.; Schmid, J.; Amrhein, N.; Schaller, A.: : A unique reaction in a common pathway: Mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* **207**:3, 325–334 (1999).
- [63] Maclean, J.; Ali, S.: : The Structure of Chorismate Synthase Reveals a Novel Flavin Binding Site Fundamental to a Unique Chemical Reaction. *Structure* **11**:12, 1499–1511 (2003).
- [64] Mousdale, D. M.; Coggins, J. R.: : Detection and subcellular localization of a higher plant chorismate synthase. *FEBS Lett* **205**:2, 328–332 (1986).
- [65] Schaller, A.; Schmid, J.; Leibinger, U.; Amrhein, N.: : Molecular cloning and analysis of a cDNA coding for chorismate synthase from the higher plant *Corydalis sempervirens* pers. *J Biol Chem* **266**:32, 21434–21438 (1991).
- [66] Basset, G. J. C.; Quinlivan, E. P.; Ravanel, S.; et al.: : Folate synthesis in plants: The p-

- aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6, 1496–1501 (2004).
- [67] Waller, J. C.; Akhtar, T. A.; Lara-Núñez, A.; et al.: : Developmental and feedforward control of the expression of folate biosynthesis genes in tomato fruit. *Mol Plant* **3**:1, 66–77 (2010).
 - [68] Garcion, C.; Lohmann, A.; Lamodièrre, E.; et al.: : Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiol* **147**:3, 1279–87 (2008).
 - [69] Gross, J.; Won, K. C.; Lezhneva, L.; et al.: : A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *J Biol Chem* **281**:25, 17189–17196 (2006).
 - [70] Guillarme, D.; Casetta, C.; Bicchi, C.; Veuthey, J.-L.: : High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *J Chromatogr A* **1217**, 6882–6890 (2010).
 - [71] The Ultimate Guide to HPLC / UHPLC. Reversed Phase Selectivity. Dostupné z URL: <<https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/reversedguide.pdf>> [cit. 04/05/2017].
 - [72] Hypercarb HPLC Columns. Dostupné z URL: <http://www.pragolab.cz/documents/hypercarb_technical.pdf> [cit. 04/05/2017].
 - [73] LC Columns and Accessories Thermo Scientific c Hypersil GOLD HPLC Columns. Dostupné z URL: <https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/guides/thermo-scientific-hypercarb-hplc-columns-guide.pdf> [cit. 04/05/2017].
 - [74] Lambert, M.; Meudec, E.; Verbaere, A.; et al.: : A High-Throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. *Molecules* **20**, 7890–7914 (2015).
 - [75] Xu, W.; Huang, M.; Li, H.; et al.: : Chemical profiling and quantification of Gua-Lou-Gui-Zhi decoction by high performance liquid chromatography/quadrupole-time- of-flight

- mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B* **986–987**, 69–84 (2015).
- [76] Wang, D.; Lu, J.; Miao, A.; et al.: : HPLC-DAD-ESI-MS / MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. *J Food Compos Anal* **21**, 361–369 (2008).
- [77] Kelebek, H.; Selli, S.; Canbas, A.; Cabaroglu, T.: : HPLC determination of organic acids , sugars , phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv . Kozan. *Microchem J* **91**, 187–192 (2009).
- [78] Simirgiotis, M. J.: : Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules* **18**, 2061–2080 (2013).
- [79] Spáčil, Z.; Nováková, L.; Solich, P.: : Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta* **76**, 189–199 (2008).
- [80] Liao, S.-G.; Zhang, L.-J.; Sun, F.; et al.: : Identification and Characterisation of Phenolics in *Polygonum capitatum* by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry. *Phytochem Anal* **24**, 556–568 (2013).
- [81] Bravo, M. N.; Feliciano, R.; Silva, S.; et al.: : Analysis of trans-resveratrol: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal. *J Food Compos Anal* **21**, 634–643 (2008).
- [82] Jaitz, L.; Siegl, K.; Eder, R.; et al.: : LC – MS / MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin , grape variety and vintage. *Food Chem* **122**, 366–372 (2010).
- [83] Dehkharghanian, M.; Adenier, H.; Vijayalakshmi, M. A.: : Study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass spectrometry. *Food Chem* **121**, 863–870 (2010).
- [84] Yang, B.; Kortensniemi, M.; Liu, P.; et al.: : Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High

- Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **60**, 8672–8683 (2012).
- [85] Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I.: : HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J Food Compos Anal* **20**, 618–626 (2007).
- [86] Kerem, Z.; Bravdo, B.; Shoseyov, O.; Tugendhaft, Y.: : Rapid liquid chromatography – ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *J Chromatogr A* **1052**, 211–215 (2004).
- [87] Ohira, H.; Torii, N.; Aida, T. M.; et al.: : Rapid separation of shikimic acid from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) with hot water extraction. *Sep Purif Technol* **69**, 102–108 (2009).
- [88] Duckstein, S. M.; Lorenz, P.; Stintzing, F. C.: : Conversion of Phenolic Constituents in Aqueous Hamamelis virginiana Leaf Extracts During Fermentation. *Phytochem Anal* **23**, 588–597 (2012).
- [89] Song, Q.; Song, Y.; Zhang, N.; et al.: : Potential of hyphenated ultra-high performance liquid chromatography-scheduled multiple reaction monitoring algorithm for large-scale quantitative analysis of traditional Chinese medicines. *R Soc Chem* **5**, 57372–57382 (2015).
- [90] de la Torre, M. P. D.; Priego-Capote, F.; de Castro, M. D. L.: : Tentative identification of polar and mid-polar compounds in extracts from wine lees by liquid chromatography – tandem mass spectrometry in high-resolution mode. *Journal Mass Spectrom* **50**, 826–837 (2015).
- [91] Chen, S.-D.; Lu, C.-J.; Zhao, R.-Z.: : Identification and Quantitative Characterization of PSORI-CM01, a Chinese Medicine Formula for Psoriasis Therapy, by Liquid Chromatography Coupled with an LTQ Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecules* **20**, 1594–1609 (2015).
- [92] Zirbs, R.; Strassl, K.; Gaertner, P.; et al.: : Exploring ionic liquid-biomass interactions: towards the improved isolation of shikimic acid from star anise pods. *R Soc Chem* **3**, 26010–26016 (2013).

- [93] Mardones, C.; Hitschfeld, A.; Contreras, A.; et al.: : Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. *J Chromatogr A* **1085**, 285–292 (2005).
- [94] Chen, S.-D.; Lu, C.-J.; Zhao, R.-Z.: : Qualitative and Quantitative Analysis of Rhizoma Smilacis glabrae by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled with LTQ OrbitrapXL Hybrid Mass Spectrometry. *Molecules* **19**, 10427–10439 (2014).
- [95] Romero, E. G.; Munoz, G. S.; Alvarez, P. J. M.; Ibáñez, M. D. C.: : Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **655**, 111–117 (1993).
- [96] Wang, H.; Helliwell, K.; You, X.: : Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chem* **68**:1, 115–121 (2000).
- [97] Vohlídal, J.; Julík, A.; Štulík, K.: : *Chemické analytické tabulky*. Praha: Grada, 1st edn.1999.
- [98] Friedman, M.; Jürgens, H. S.: : Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem* **48**:6, 2101–2110 (2000).
- [99] Šmeringaiová I.: Charakterizace a regulace šikimátdehydrogenasy z kořene petržele. Diplomová práce, Univerzita Karlova, 2014 (str. 36).